



**“DESARROLLO Y FABRICACIÓN DE UN  
BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO ENZIMÁTICO  
PARA MONITOREAR NIVELES DE GLUCOSA EN  
SISTEMAS MICROFLUÍDICOS DE CULTIVO  
CELULAR”**

TESIS PRESENTADA POR:

**M.C. LOURDES NAVARRO NATERAS**

DIRIGIDA POR:

**DR. JANNÚ RICARDO CASANOVA MORENO**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORADO EN ELECTROQUÍMICA**

**JULIO, 2025**

## Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

REALIZADO POR:  
M.C. Lourdes Navarro Nateras

DIRIGIDA POR:  
Dr. Jannú Ricardo Casanova Moreno

CODIRIGIDA POR:  
Dr. Goldie Harikrishna Oza

### SINODALES

Dr. Raúl Martín Ortega Borges  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Abraham Ulises Chávez Ramírez  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Beatriz Liliana España Sánchez  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Gabriel Luna Bárcenas  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Francisco Mherande Cuevas Muñiz  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma



## RESUMEN

---

La integración de biosensores en sistemas microfluídicos de cultivo celular es de suma importancia para comprender a detalle la fisiología celular, enfermedades y la respuesta celular ante diversos fármacos. Es necesario monitorear diversos parámetros (pH, glucosa, O<sub>2</sub>, etc.) para mantener cultivos celulares viables y estudiar las respuestas ante estímulos específicos. En particular el monitoreo de glucosa es importante porque es la fuente principal de energía celular, su relevancia en el monitoreo de diabetes, en el crecimiento de células cancerígenas y por su relación con la proliferación y viabilidad celular. Este trabajo evalúa biosensores enzimáticos de primera y segunda generación para detectar glucosa en medios de cultivo celular. Para lograr el objetivo se evaluaron diferentes composiciones para la fabricación de los biosensores, resaltando la evaluación de dos entrecruzadores para su inmovilización sobre la superficie del electrodo. Se evaluaron diferentes composiciones de glutaraldehído (GA) y etilenglicol diglicidil éter (EGDGE), poli-etilenimina ramificada (BPEI) con o sin el mediador (Os) y la enzima glucosa oxidasa (GOx). Adicionalmente, se evaluaron electrodos de oro policristalino, electrodos serigrafados de carbono (SPE) y puntillas de carbono (PGE) en medios de cultivo celular como RPMI 1640 y DMEM suplementados con suero fetal bovino (SFB), siendo los más comunes en el manejo de diversas líneas celulares. Se observó que los electrodos de oro policristalino no son adecuados para las evaluaciones en medios de cultivo celular porque son susceptibles a la pasivación por los componentes del medio. Por otro lado, el uso de SPE o PGE de carbono es una alternativa funcional para trabajar en medios de cultivo celular, debido a que su rendimiento no se ve afectado. Se determinó que los biosensores enzimáticos de primera generación evaluados en este proyecto no son capaces de detectar glucosa en medios de cultivo celular; los potenciales utilizados y la presencia de interferentes en el medio impiden la difusión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y, en consecuencia, no es posible obtener una respuesta estable. La causa es atribuible a los mecanismos de transferencia de carga. En el caso de los biosensores enzimáticos de segunda generación, el transporte de electrones entre los centros redox del Os permitió la detección de glucosa. Adicionalmente, el uso de menores potenciales los hace menos susceptibles a interferentes. Por lo tanto, presentan parámetros adecuados para la detección de glucosa en medios complejos. Finalmente, el uso de PGE permitió la integración de los biosensores de segunda generación en chips microfluídicos destinados para cultivo celular. En las evaluaciones dentro del chip microfluídico con OsBPEI/GOx/EGDGE, que presentó las mejores características, se obtuvo un límite de detección de 0.5 mM, sensibilidad de 4.69  $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  y el rango lineal entre 0 – 10 mM al realizar las evaluaciones con flujo continuo en medio de cultivo RPMI 1640 con 5 % SFB.

**Palabras clave:** glutaraldehído, EGDGE, biosensor, entrecruzador, organ-on-a-chip, glucosa.

## ABSTRACT

---

The integration of biosensors into microfluidic cell culture systems is important for a detailed understanding of cell physiology, disease mechanisms, and cellular responses to drugs. Monitoring several parameters (pH, glucose, O<sub>2</sub>, etc.) is essential to maintain adequate cell cultures and to study their responses to specific stimuli. In particular, glucose monitoring is crucial due to its role as the primary source of cellular energy, its relevance in diabetes monitoring, cancer cell proliferation, and its relationship with cell viability and proliferation. This study evaluates first- and second-generation enzymatic biosensors for glucose detection in cell culture media. To achieve this objective, different biosensor compositions were assessed, with special focus on two crosslinkers for enzyme immobilization on the electrode surface. Different formulations were tested using glutaraldehyde (GA) or ethyleneglycol diglycidyl ether (EGDGE), branched polyethyl-eneimine (BPEI) with or without the mediator (Os), and glucose oxidase (GOx). Additionally, polycrystalline gold electrodes, carbon screen-printed electrodes (SPE), and pencil graphite electrodes (PGE) were tested in cell culture media such as RPMI 1640 and DMEM, both supplemented with fetal bovine serum (FBS), as they are commonly used for culturing various cell lines. As results showed, polycrystalline gold electrodes are not suitable for evaluations in cell culture media, due to passivation by medium components. On the other hand, SPEs and PGEs proved to be functional alternatives, as their performance remained unaffected. First-generation enzymatic biosensors evaluated in this study were unable to detect glucose in cell culture media; the operating potentials and the presence of interfering species impeded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffusion, resulting in unstable responses. This limitation is attributed to the charge transfer mechanism. In contrast, second-generation enzymatic biosensors facilitated glucose detection through electron hopping via the redox centers of Os. Furthermore, their operation at lower potentials makes them less susceptible to interference, enabling glucose detection in complex media. Finally, the use of PGEs allowed the integration of second-generation biosensors into microfluidic chips designed for cell culture. Evaluations conducted within the microfluidic chip using OsBPEI/GOx/EGDGE, exhibited the most favorable characteristics, with a detection limit of 0.5 mM, a linear range from 0 - 10 mM, and a sensitivity of 4.69  $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  under continuous flow conditions in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS.

**Keywords:** glutaraldehyde, EGDGE, enzymatic biosensor, crosslinker, organ-on-a-chip, glucose.

## IMPACTO SOCIAL DEL PROYECTO DE TESIS

---

Actualmente, el desarrollo de tecnologías que permitan estudiar con precisión los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades como el cáncer tiene un impacto significativo en la salud pública global. A nivel internacional, existe un interés creciente por el diseño de plataformas *in vitro* que repliquen de manera fiel el comportamiento de órganos y tejidos, con el fin de reducir la dependencia de modelos animales, acelerar el desarrollo de fármacos y ofrecer medicina personalizada. En este contexto, los sistemas *organ-on-a-chip* se han consolidado como herramientas innovadoras que permiten estudiar procesos celulares en condiciones controladas, con aplicaciones directas en investigación médica, farmacología y toxicología.

El enfoque del proyecto está en el desarrollo de tecnología aplicada para el monitoreo de glucosa a través de la integración de biosensores electroquímicos en plataformas microfluídicas de cultivo celular como los modelos *organ-on-a-chip*. Punto clave para el monitoreo y control para el desarrollo de futuros dispositivos. Altamente relevante a nivel internacional, ya que responde a la necesidad de contar con métodos más rápidos, sensibles, reproducibles y accesibles para la evaluación de modelos *organ-on-a-chip* que representan diversas enfermedades como el cáncer de mama, que es una de las principales causas de mortalidad en mujeres a nivel mundial.

En México, el cáncer de mama es una prioridad de salud pública, especialmente entre mujeres mayores de 40 años, por su alta tasa de mortalidad en poblaciones de bajos recursos. Lo cual evidencia la necesidad de implementar estrategias de diagnóstico, monitoreo y tratamiento más eficaces. Por esta razón, el desarrollo de este tipo de dispositivos representa un paso importante en el área de salud, así como en el fortalecimiento del desarrollo científico nacional y la innovación con impacto directo en la calidad de vida de los pacientes. Además, el proyecto sienta las bases para el desarrollo de futuros dispositivos personalizados para la evaluación directa de tratamientos en muestras de pacientes, lo cual podría cambiar drásticamente la forma en que se diagnostican y tratan enfermedades.





**Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección del Dr. Jannú Ricardo Casanova Moreno y la codirección del Dr. Goldie Harikrishna Oza.**



## Agradecimientos

Agradezco al CIDETEQ y CONAHCYT por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar los estudios de doctorado. Así mismo, agradezco al Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica (LABMyN) y especialmente al Dr. Luis Gerardo Arriaga Hurtado por integrarme en su grupo de trabajo, por impulsar mis ideas y por la experiencia profesional que me brindó en estos años.

Agradezco infinitamente al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por su tiempo y la capacitación para desarrollar el capítulo II de este proyecto. Por abrirme las puertas y darme conocimientos valiosos por su larga trayectoria. De igual manera, estaré profundamente agradecida con el equipo y colaboradores del Dr. Alejandro Zentella que pertenecen a la unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Especialmente al Mtro. José Luis Ventura por facilitarnos y brindarnos todo lo necesario para realizar los experimentos y la Mtra. Gabriela Guadarrama del Laboratorio de Biología de la Reproducción por la donación de cultivos de la línea celular EA.hy 926.

Agradezco al Dr. Fernando Battaglini y la Dra. Lucy Coria del INQUIMAE-UBA, quienes han desarrollado el sistema con BPEI modificada con compuestos de Os y la elaboración de los electrodos serigrafados de carbono, elementos fundamentales en el desarrollo del capítulo III del proyecto.

Agradezco a la Dra. Susana Citlaly Gaucin Gutiérrez del CIDETEQ por su apoyo para realizar las evaluaciones de SEM y EDX a los PGE utilizados en el capítulo III y V del proyecto.

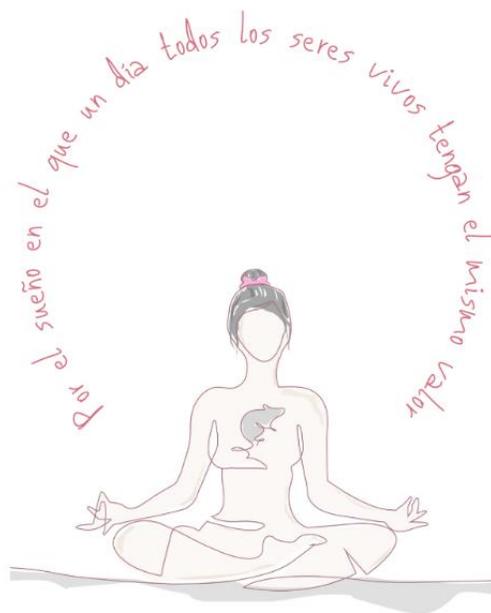
Agradezco al Dr. Jannú Ricardo Casanova Moreno por su apoyo para asistir al “241st Electrochemical Society Meeting” en Vancouver, Canadá con la presentación de la ponencia “Electrochemical and Optical Detection of Plant DNA for Sex Determination in a Lab-on-a-Chip prototype”. De igual manera, por su apoyo para asistir al “34 Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry” en Mar del Plata, Argentina con la presentación de la ponencia “Evaluation of an Electrochemical Biosensor for Glucose Detection in a Breast Cancer-on-a-Chip Prototype”.

Agradezco profundamente a mis asesores por los consejos, por capacitarme en cada una de las técnicas, por su paciencia, por el conocimiento y las propuestas, por los regaños, por creer en mis ideas y por formarme como investigadora. Agradezco que me hayan hecho una mejor persona.

Agradezco con mucho cariño a mis compañeros de laboratorio, al personal de CIDETEQ y a todas las personas y animalitos que se cruzaron en mi camino durante mis estudios, por alegrarme los días, por el apoyo y por salvarme tantas veces. Los llevaré siempre con cariño en el corazón.

Agradezco también a mi familia, mis padres, hermanos y a mi tía, por aguantarme y apoyarme estos años. A todas mis amigas, que me atrevo a decir que son mi familia. Todos ustedes me han apoyado en los peores momentos, me han animado en los días difíciles y justo cuando he dejado de creer en mí, han estado para levantarme. Agradezco profundamente por su interés y orgullo, por sus abrazos, por las risas, por cumplir mis sueños y por todo el cariño que me han mostrado. Gracias a ustedes estoy y soy la persona más afortunada por tenerlos en mi vida. Mi corazón es suyo para siempre.

Finalmente, como una parte importante de mi vida, porque va de la mano con mis objetivos, en donde la vida de un animalito debe ser respetada, valiosa y salvada, a mis compañeritos de vida por existir y hacer que cada uno de mis días haya valido la pena. Con todo el amor del mundo para Pascal, Emma, Milo, Omega, Alanis, Goofy, Linda, Blanquitas y Tomás, que son parte de mí y los llevo siempre en el corazón.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
IMPACTO SOCIAL DEL PROYECTO DE TESIS.....	5
.....	5
Capítulo I - Introducción.....	24
1.1 Introducción.....	24
1.2 Justificación.....	26
1.3 Hipótesis.....	27
1.4 Objetivos.....	28
1.4.1 Objetivo general.....	28
1.4.2 Objetivos específicos.....	28
Capítulo II – Cultivo Celular.....	30
2.1 Cultivos celulares en 2D.....	30
2. Cultivos celulares en 3D.....	31
2.2.1 Esferoides.....	32
2.2.2 Organ-on-a-chip.....	33
2.3 Metodología.....	34
2.1 Cultivo de líneas celulares.....	34
2.3.2 Valoración y elaboración de subcultivos.....	36
2.4 Resultados.....	38
2.4.1 Valoración de la línea celular EA.hy 926.....	38
2.4.2 Valoración de la línea celular RAW 264.7.....	40
2.4.3 Valoración visual de la línea celular MCF-7.....	43
2.4.3.1 Valoración de esferoides generadas con la línea celular MCF-7.....	45
2.4.4 Valoración visual de la línea celular DSG-BC-1.....	47
2.4.5 Valoración visual de la línea celular DSG-BC-2.....	48
2.4.6 Valoración visual de la línea celular MDA-MB-31.....	51
2.4.7 Valoración visual de la línea celular ECL-1.....	52
2.4.8 Valoración visual de la línea celular ECL-2.....	53

2.5 Conclusiones .....	56
Capítulo III – Biosensor electroquímico .....	58
3.1 Técnicas electroquímicas .....	59
3.1.1 Voltamperometría cíclica .....	62
3.1.2 Cronoamperometría .....	64
3.2 Biosensores .....	64
3.2.1 Biorreceptores.....	66
3.2.2 Transductores .....	66
3.2.2.1 Transductores electroquímicos .....	66
3.2.2.2 Transductores amperométricos .....	67
3.3 Biosensores electroquímicos .....	67
3.3.1 Biosensores electroquímicos enzimáticos .....	68
3.3.1.2 Generaciones de electrodos enzimáticos .....	70
3.3.2 Inmovilización enzimática.....	71
3.4 Diseño y fabricación de electrodos.....	72
3.4.1 Diseño y fabricación del chip electroquímico en gota .....	72
3.4.2 Depósito por evaporación de haz de electrones.....	73
3.4.3 Electrodos de oro policristalino.....	74
3.4.3.1 Limpieza de electrodos de oro policristalino .....	75
3.4.4 Electrodos serigrafiados de carbono .....	75
3.4.4.1 Limpieza de electrodos serigrafiados de carbono.....	76
3.4.5 Puntillas de carbono como electrodos de trabajo .....	77
3.4.5.1 Limpieza de puntillas de carbono como WE.....	77
3.5 Evaluación y desarrollo de biosensores electroquímicos.....	78
3.5.1 Biosensores enzimáticos de primera generación .....	81
3.5.1.1 Evaluación de biosensores enzimáticos de primera generación en electrodos de oro...82	
3.5.1.2 Evaluación de biosensores enzimáticos de primera generación en electrodos serigrafiados de carbono.....	88
3.5.2 Biosensores enzimáticos de segunda generación.....	93
3.5.2.1 Evaluación de biosensores enzimáticos de segunda generación en electrodos de oro .94	
3.5.2.2 Evaluación de biosensores enzimáticos de segunda generación en electrodos serigrafiados de carbono.....	97
3.5.2.3 Evaluación de interferentes en biosensores enzimáticos de segunda generación en electrodos serigrafiados de carbono .....	111
3.5.3 Evaluación de biosensores enzimáticos de segunda generación en puntillas de carbono. ....	117

3.6 Conclusiones .....	124
Capítulo IV – Chip microfluídico .....	126
4. Microfluídica .....	126
4.1. Litografía suave .....	127
4.2 Fotolitografía .....	128
4.3 Impresión 3D.....	129
4.4 Diseño y fabricación de chips microfluídicos .....	130
4.5 Depósito de hidrogeles para cultivo celular en chips microfluídicos .....	139
4.6 Conclusiones .....	145
Capítulo V. Integración del sistema electroquímico en el chip microfluídico .....	147
5.1 Integración de biosensores enzimáticos de segunda generación en un chip microfluídico	147
5.2 Conclusiones .....	155
Capítulo VI – Referencias .....	157
6. Referencias.....	157
Capítulo VII – Anexos .....	169
7.1 Composición del medio de cultivo D-MEM <sup>163</sup> .....	169
7.2 Composición del medio de cultivo DMEM/F12 <sup>164</sup> .....	170
7.3 Composición del medio de cultivo RPMI 1640 <sup>165</sup> .....	172
7.4 Composición del Suero Fetal Bovino <sup>94</sup> .....	174

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de un esferoide. En este tipo de estructuras los niveles de oxígeno y la disposición de nutrientes es diferente en el núcleo y en la superficie, por lo tanto, la viabilidad de las células y su comportamiento varía según su ubicación <sup>43</sup> .....	33
Figura 2. a) Campana de seguridad biológica nivel II con flujo laminar. b) Incubadora con control de CO <sub>2</sub> .....	35
Figura 3. Botella de cultivo de 78 cm <sup>2</sup> con tapa con filtro incorporado. Cultivo de células EA.hy 926 en medio DMEM/F12 suplementado con 5 % de SFB.....	39
Figura 4. Micrografía del cultivo celular EA.hy 926. Imagen de contraste de fases a 40X, se muestran dos campos representativos del cultivo correspondiente a la Figura 3. ....	39
Figura 5. Micrografía del cultivo celular RAW 264.7. Imagen de contraste de fases a 40X. ....	41
Figura 6. Micrografía del cultivo celular RAW 264.7 en la solución de tripsina-EDTA. Imagen de contraste de fases a 40X. ....	42
Figura 7. Formación del pellet del cultivo celular RAW 264.7.....	42
Figura 8. Micrografía del cultivo celular MCF-7. Imagen de contraste de fases a 40X.....	44
Figura 9. Caja Petri de poliestireno para cultivo celular (10 cm de diámetro) con el cultivo de la línea celular MCF.7.....	44
Figura 10. Formación de un único esferoide por pocillo a partir de células primarias de hepatocitos de humano. Los esferoides se forman en 5 días y pueden realizarse evaluaciones a partir del séptimo día <sup>43</sup> .....	45
Figura 11. Se muestra la formación de esferoides a partir de dos tipos celulares. En la línea celular T47D (A) se observa un aumento de tamaño y el oscurecimiento de los núcleos, se considera un crecimiento ideal en el día 5. En el caso de la línea celular SKOV-3 (B) se observa una disminución de tamaño y la fragmentación de la estructura, se considera un crecimiento ideal en el día 1. Por lo tanto, es necesario estandarizar las condiciones para cada tipo celular <sup>43</sup> . ...	46
Figura 12. Micrografía de la formación de esferoides (48 h) con 5x10 <sup>4</sup> células/250 µl con el cultivo celular MCF-7. Imagen de contraste de fases a 40X.....	47
Figura 13. Micrografía del cultivo celular DSG-BC-1. Imagen de contraste de fases a 40X.....	48
Figura 14. Micrografía del cultivo celular DSG-BC-2. Imagen de contraste de fases a 40X.....	49
Figura 15. Micrografía del cultivo celular DSG-BC-2 en una microplaca de ultra baja adherencia para la formación de esferoides. Imagen de contraste de fases a 40X. ....	50
Figura 16. Micrografía de la formación de esferoides (48 h) con 5x10 <sup>4</sup> células/250 µl con el cultivo celular DSG-BC-2 por duplicado. Imagen de contraste de fases a 40X. ....	50

Figura 17. Micrografía del cultivo celular MDA-MB-31. Imagen de contraste de fases a 40X. ...	51
Figura 18. Micrografía del cultivo celular ECL-1. Imagen de contraste de fases a 40X. ....	52
Figura 19. Micrografía del cultivo celular ECL-2. Imagen de contraste de fases a 40X. ....	53
Figura 20. Microplaca de ultra baja adherencia para la formación de esferoides. ....	53
Figura 21. Micrografía de la formación de esferoides (48 h) con $5 \times 10^4$ células/250 $\mu$ l con el cultivo celular ECL-2 por duplicado. Imagen de contraste de fases a 40X. ....	54
Figura 22. Micrografía de la formación de esferoides (48 h) con $1 \times 10^5$ células/250 $\mu$ l con el cultivo celular ECL-2. Imagen de contraste de fases a 40X. ....	55
Figura 23. Modos de transporte de masa <sup>69</sup> . ....	62
Figura 24. Señal de excitación potencial-tiempo en VC <sup>69</sup> . ....	62
Figura 25. VC de un proceso redox reversible $O + ne^- \leftrightarrow R$ <sup>69</sup> . ....	63
Figura 26. Tipos de componentes en biosensores. ....	65
Figura 27. Generaciones de electrodos enzimáticos amperométricos. a) Con el uso de los sustratos secundarios naturales. b) Con el uso de mediadores redox. c) A través de la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo. ....	71
Figura 28. Diseño de chip en gota de tres electrodos. ....	72
Figura 29. Sustrato de vidrio con el depósito de Ti (20 nm) y Au (300 nm) por evaporación de haz de electrones. ....	74
Figura 30. Revelado del depósito de Ti (20 nm) y Au (300 nm) con el removedor AZ 400T (12 h). ....	74
Figura 31. Microscopia óptica (4X) del depósito del electrodo de trabajo de oro policristalino. ....	74
Figura 32. Celda electroquímica con el diseño del chip en gota de 3 electrodos. Utilizando Au para WE y CE, y un alambre de Ag AgCl como electrodo de pseudoreferencia. ....	75
Figura 33. a) Celda electroquímica con electrodos serigrafiados de carbono. b) Chip serigrafiado con WE, CE y RE de carbono. ....	76
Figura 34. Microscopia óptica (4X) del depósito del electrodo de trabajo de carbón. ....	76
Figura 35. Puntillas de carbono como electrodos de trabajo. ....	77
Figura 36. Estructura química del a) EGDGE y de b) GA <sup>92</sup> . ....	78
Figura 37. Reacciones de aminas a) primarias y b) secundarias con epóxidos <sup>91</sup> . ....	79
Figura 38. Reacciones de aminas a) primarias y b) secundarias con aldehídos <sup>91</sup> . ....	79
Figura 39. Estructura química del polímero redox OsCOOHBPEI <sup>93</sup> . ....	80
Figura 40. Estructura química del polímero redox OsBPEI <sup>93</sup> . ....	80
Figura 41. Microscopia óptica (4X) del depósito de hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % sobre el WE antes (a) y después (b) de enjuagar para retirar el exceso de polímero. ....	83

Figura 42. Microscopia óptica (4X) del depósito de hidrogel BPEI/GOx/EGDGE 7.5 % sobre el WE antes (a) y después (b) de enjuagar para retirar el exceso de polímero. ....	83
Figura 43. Voltamperograma cíclico en PB 0.1 M pH 7.4 para determinar el potencial de oxidación del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en BPEI/GOx/GA al 0.45 % . ....	83
Figura 44. Voltamperograma cíclico con el hidrogel BPEI/GOx/GA al 0.45 % para verificar la actividad enzimática con una solución de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4. ....	84
Figura 45. Cronoamperogramas de las evaluaciones con el depósito de hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % con glucosa 0 - 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4. ....	84
Figura 46. Curvas de calibración obtenidas con el hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % con una glucosa 0 - 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4. Evaluación cronoamperométrica. ....	85
Figura 47. Microscopia óptica (4X) del depósito de hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % después de realizar curvas de calibración con glucosa 0 - 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4. ....	85
Figura 48. Evaluaciones con el hidrogel BPEI/GOx/EGDGE 7.5 % con glucosa 0, 10 y 50 mM en PB 0.1 M pH 7.4. Evaluación cronoamperométrica. ....	86
Figura 49. Microscopia óptica (4X) del depósito de hidrogel BPEI/GOx/EGDGE 7.5 % sobre el WE después de evaluaciones de soluciones con glucosa 0, 10 y 50 mM. ....	86
Figura 50. Curva de calibración obtenida con el hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % con glucosa 0 - 10 mM en el medio de cultivo RPMI 1640. Evaluación cronoamperométrica.....	87
Figura 51. Voltamperogramas cíclicos de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en PB 0.1 M pH 7.4 y en el medio de cultivo RPMI 1640 sobre un WE de oro. ....	88
Figura 52. Curva de calibración de glucosa 0 - 100 mM en medio de cultivo RPMI 1640 en el sistema BPEI/GOx/GA 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica n=3.....	89
Figura 53. Curva de calibración de glucosa 0 - 100 mM en medio de cultivo RPMI 1640 en OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica n=3.....	89
Figura 54. a, b) Esquemas de los efectos de adsorción/absorción de los componentes del medio sobre el mecanismo de transferencia de carga de biosensores de a) primera y b) segunda generación. ....	90
Figura 55. Evaluación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0 – 100 mM en SPE y SPE modificados con BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE en a) PB 0.1 M pH 7.4 y b) medio de cultivo RPMI con 5 % SFB. ....	91
Figura 56. Curvas de calibración de glucosa 0 – 100 mM en PB 0.1 M, pH 7.4, basadas en evaluaciones cronoamperométricas utilizando hidrogeles *BPEI/GOx/GA y *BPEI/GOx/EGDGE. Evaluaciones realizadas en electrodos independientes. ....	92
Figura 57. Evaluación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0 – 100 mM en SPE y SPE modificados con *BPEI/GOx/GA y *BPEI/GOx/EGDGE en a) PB 0.1 M pH 7.4 y b) medio de cultivo RPMI con 5 % SFB.....	93
Figura 58. Voltamperogramas cíclicos del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM con concentraciones de GA de 3.33, 17.5 y 33.3 %, para determinar el E <sub>pa</sub> del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. WE = oro. ....	95
Figura 59. Curva de calibración de glucosa 0 - 100 mM en el sistema OsBPEI/GOx/GA con	

concentraciones de GA 3.33, 17.5 y 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica (WE = oro). ...95

Figura 60. Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM) en medio de cultivo RPMI 1640 sobre el sistema OsBPEI/GOx/GA y OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM en electrodos de oro policristalino. Evaluación cronoamperométrica. ....96

Figura 61. Voltamperograma cíclico del sistema (SPE) OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. ....97

Figura 62. Curva de calibración de glucosa (0 - 50 mM) sobre el sistema OsBPEI/GOx/ EGDGE 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica (SPE). ....98

Figura 63. Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. ....99

Figura 64. Curva de calibración de glucosa (0 - 50 mM) sobre el sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica (SPE). ....99

Figura 65. Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEICOOH/GOx/EGDGE 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M, pH 7.4, 100 mV/s. .... 100

Figura 66. Curva de calibración de glucosa (0-50 mM) sobre el sistema OsBPEICOOH/GOx/EGDGE 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica. .... 100

Figura 67. Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEICOOH/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. .... 101

Figura 68. Curva de calibración de glucosa (0-50 mM) sobre el sistema OsBPEICOOH/ GOx/GA 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica. .... 101

Figura 69. VC del sistema OsBPEI/GOx/GA con diferentes concentraciones de GA 3.33, 17.5 y 33.3 mM. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 2 mV/s. .... 102

Figura 70. Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM) en el sistema OsBPEI/GOx/GA con concentraciones de GA 3.3, 16.5y 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica. .... 103

Figura 71. VC del sistema OsBPEI/GOx/EGDGE con diferentes concentraciones de EGDGE 3.33, 16.5 y 33.3 mM. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 2 mV/s. .... 104

Figura 72. Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM) en el sistema OsBPEI/GOx/GA con concentraciones de GA 3.33, 16.5 y 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica. .... 104

Figura 73. Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM) en medio RPMI 1640 con OsBPEI/GOx/GA y OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM. Evaluación CA de diferentes chips. .... 105

Figura 74. Curva de calibración (CC) de glucosa (0 - 100 mM) en medio de cultivo RPMI 1640 en el sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM. Evaluación CA en el mismo chip. .... 106

Figura 75. Curva de calibración (CC) de glucosa (0 - 100 mM) en medio RPMI 1640 en el sistema OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM. Evaluación CA en el mismo chip. .... 106

Figura 76. Evaluación del sistema OsBPEI/GOx/GA y OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM en medio de cultivo RPMI 1640 (glucosa 5 mM) con SFB entre 2.5 - 10 %. Evaluación cronoamperométrica. .... 107

Figura 77. Dependencia de la corriente en SPEs modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE con respecto a A, C) la velocidad de barrido o B, D) la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en PB 0.1 M, pH 7.4, en ausencia de glucosa. ....	111
Figura 78. Evaluación de los interferentes: AA, AU y AL en SPE modificados con OsBPEI/GOx/GA en PB 0.1 M pH 7.4 A) con glucosa 5 mM y B) sin glucosa. Adicionalmente se evaluó una solución 5 mM de glucosa como control. ....	112
Figura 79. Voltamperogramas cíclicos de SPE modificados con a) OsBPEI/GOx/GA o b) OsBPEI/GOx/EGDGE en una solución 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4 con concentraciones entre 0 – 5 mM de AL.....	113
Figura 80. Voltamperogramas cíclicos de SPE modificados con A) OsBPEI/GOx/GA o B) OsBPEI/GOx/EGDGE en una solución 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4 con concentraciones entre 0 – 5 mM de AA. ....	114
Figura 81. Voltamperogramas cíclicos de SPE modificados con A) OsBPEI/GOx/GA o B) OsBPEI/GOx/EGDGE en una solución 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4 con concentraciones entre 0 – 5 mM de AU.....	114
Figura 82. Evaluación de los interferentes: ácido ascórbico, ácido úrico y ácido láctico en SPE modificados con OsBPEI/GOx/EGDGE en PB 0.1 M pH 7.4 A) con glucosa 5 mM y B) sin glucosa. Solución 5 mM de glucosa como control en cada evaluación.....	115
Figura 83. Evaluación de los interferentes: ácido ascórbico, ácido úrico y ácido láctico en PB 0.1 M pH 7.4 sin glucosa, sobre SPE sin modificación.....	116
Figura 84. Voltamperogramas cíclicos de AL, AA y AU en PB 0.1 M pH 7.4 en A) SPE y B – D) SPE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. B) Evaluación de AL, C) Evaluación de AA y D) Evaluación de AU. ....	117
Figura 85. Marcas de puntillas de carbono utilizadas como electrodos de trabajo. ....	118
Figura 86. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el $E_{pa}$ del Os en puntilla Foray. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. b) Curvas de calibración (CC) de glucosa (0 - 100 mM). Evaluación cronoamperométrica en puntilla Foray. ....	119
Figura 87. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el $E_{pa}$ del Os en puntilla HB azul. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. b) Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM). Evaluación cronoamperométrica en puntilla HB azul.....	120
Figura 88. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el $E_{pa}$ del Os en puntilla HB negro. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. b) Curva de calibración (CC) de glucosa (0-100 mM). Evaluación cronoamperométrica en puntilla HB negro. ....	120
Figura 89. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el $E_{pa}$ del Os en puntilla Teeny Tino. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. b) Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM). Evaluación cronoamperométrica en Teeny Tino. ....	121
Figura 90. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el $E_{pa}$ del Os en puntilla Staedtler. Electrolito soporte: PB 0.1 M, pH 7.4, 100 mV/s. b) Curva de	

calibración (CC) de glucosa (0 - 100 mM). Evaluación cronoamperométrica en Staedtler.....	122
Figura 91. A-C) Imágenes del depósito de hidrogeles OsBPEI/GOx/GA sobre PGE. A) Campo claro, B) fluorescencia y C) microscopía electrónica de barrido. D-G) Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX) de D) carbono, E) oxígeno, F) osmio y G) fósforo. ....	123
Figura 92. Medidas características utilizadas en los dispositivos microfluídicos <sup>112</sup> . ....	126
Figura 93. Ilustración de la técnica Litografía suave. a) El molde es una pieza de silicio con patrones circulares. b) Se agrega PDMS al molde. c) Se obtiene una pieza de PDMS con el patrón del molde <sup>135</sup> . ....	128
Figura 94. Fotolitografía. a) La imagen superior muestra el depósito de la fotoresina en el sustrato y la imagen inferior muestra la fotoresina distribuida de manera uniforme. b) El sustrato se expone a luz UV. c) Se observa el patrón de interés <sup>136</sup> . ....	129
Figura 95. Diseño y configuración del chip microfluídico con tres cámaras de cultivo interconectadas y 4 canales para suministrar medio de cultivo celular. ....	130
Figura 96. Integración de sensores en un chip microfluídico de cultivo celular. ....	131
Figura 97. Diseño del molde de canales microfluídicos. ....	132
Figura 98. Molde para fabricación de canales microfluídicos. ....	132
Figura 99. a) Elaboración de piezas de PDMS con el molde obtenido por impresión 3D. b) Elaboración de chip microfluídico en PDMS-vidrio. ....	133
Figura 100. Esquema del tratamiento con plasma a una superficie de PDMS <sup>136</sup> . ....	133
Figura 101. Diseño del chip microfluídico para tres líneas celulares. ....	134
Figura 102. Esquema del chip microfluídico para tres líneas celulares. ....	134
Figura 103. a) Diseño del molde de un chip con 3 cámaras de cultivo para impresión 3D. b) Molde realizado por impresión 3D de un chip con 3 cámaras de cultivo. ....	135
Figura 104. a) Diseño de prueba para impresión 3D. b) Molde realizado por impresión 3D del molde de prueba. ....	136
Figura 105. Microscopía óptica (4X) a) Molde de prueba con tiempo de exposición de 9 s. b) Molde de prueba con tiempo de exposición de 3 s. ....	136
Figura 106. Transferencia de patrones en una oblea de silicio. ....	137
Figura 107. Microscopía óptica (4x) de los patrones en la oblea de silicio. a) Chip de tres canales de cultivo 30 mW 65 %. b) Chip de dos canales de cultivo 20 mW 60 %. ....	138
Figura 108. Microscopía óptica (4x) de los patrones en la oblea de silicio. Chip de dos canales de cultivo 20 mW 60 % después de aplicar PDMS. ....	138
Figura 109. Chip microfluídico de PDMS con tres cámaras de cultivo unido a un sustrato de vidrio. ....	139
Figura 110. Depósito de hidrogel de alginato de sodio en chip microfluídico. ....	140

Figura 111. Evaluación del flujo de agua con colorante vegetal en los canales microfluídicos. ....	140
Figura 112. Diseño de chip microfluídico con dos cámaras de cultivo celular. Las estructuras que separan los canales son triángulos con una base de 350 $\mu\text{m}$ y altura de 150 $\mu\text{m}$ . ....	141
Figura 113. Diseño de chip microfluídico con dos cámaras de cultivo celular. Las estructuras que separan los canales son óvalos de 200 x 500 $\mu\text{m}$ . ....	141
Figura 114. Diseño de chip microfluídico con dos cámaras de cultivo celular. Las estructuras que separan los canales ocupan un área de 410 x 590 $\mu\text{m}$ . ....	142
Figura 115. Molde de SU8-50 en oblea de silicio del chip microfluídico con dos cámaras de cultivo celular. ....	142
Figura 116. Fabricación de chips microfluídicos en PDMS-vidrio. ....	143
Figura 117. Depósito de hidrogel de colágeno al 30 % en el chip microfluídico con dos cámaras de cultivo. ....	143
Figura 118. Depósito de Matrigel en la cámara de cultivo de un chip microfluídico. Flujo de una solución de fluoresceína 1 mM a través del canal para medio de cultivo y la cámara de cultivo. ....	144
Figura 119. Puntillas de carbono modificadas con OsBPEI/GOx/GA (WE). ....	147
Figura 120. Esquema del chip microfluídico con los electrodos integrados. ....	148
Figura 121. Modificación del chip microfluídico para la integración de los electrodos. ....	148
Figura 122. Chip microfluídico integrado con el sistema electroquímico. ....	149
Figura 123. Curva de calibración de glucosa 0 – 100 mM en medio de cultivo RPMI-1640 con 5 % SFB. Las evaluaciones fueron realizadas dentro del canal microfluídico con PGE modificados con el depósito de OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Se utilizó un flujo de 100 $\mu\text{L}/\text{h}$ . Las barras de error representan la desviación estándar de tres evaluaciones realizadas en electrodos independientes. Las líneas punteadas representan el ajuste de los datos con respecto a la constante de Michaelis-Menten, calculada a través de un ajuste no lineal. ....	149
Figura 124. Prueba de estabilidad en PGE con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Las evaluaciones se realizaron en el chip microfluídico con un flujo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ . ....	151
Figura 125. Cronoamperometría de la prueba de estabilidad realizada con PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Las evaluaciones se realizaron en el chip microfluídico con un flujo continuo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ . ....	151
Figura 126. Capacidad de respuesta de PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Soluciones 4.5 y 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4. ....	152

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de transductores electroquímicos para distintos tipos de mediciones <sup>79</sup> .....	67
Tabla 2. Composición de hidrogeles enzimáticos de primera generación .....	82
Tabla 3. Composición actual de hidrogeles enzimáticos de primera generación .....	91
Tabla 4. Composición del hidrogel .....	94
Tabla 5. Comparación del LOD, LOQ, sensibilidad, estabilidad, rango lineal y R <sup>2</sup> de diferentes composiciones del hidrogel. ....	108
Tabla 6. Comparación de K <sub>m</sub> <sup>app</sup> y la j <sub>max</sub> de hidrogeles con diferente composición. Los datos fueron obtenidos de 3 electrodos independientes. ....	109
Tabla 7. Comparación de K <sub>m</sub> <sup>app</sup> y la j <sub>max</sub> de hidrogeles con diferente composición. Los datos fueron obtenidos de 3 evaluaciones consecutivas en un mismo electrodo. ....	110
Tabla 8. Comparación del LOD, LOQ, sensibilidad, estabilidad, rango lineal y R <sup>2</sup> de PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. ....	150
Tabla 9. Comparación de K <sub>m</sub> <sup>app</sup> y la j <sub>max</sub> de PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Los datos fueron obtenidos de 3 electrodos independientes. ....	150
Tabla 10. Comparación de K <sub>m</sub> <sup>app</sup> y la j <sub>max</sub> de PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Datos obtenidos de 3 evaluaciones consecutivas en un mismo electrodo. ....	150
Tabla 11. Comparación de los parámetros de rendimiento de biosensores para detección de glucosa basados en GOx. ....	154



# CAPÍTULO I

---

## INTRODUCCIÓN

## Capítulo I - Introducción

### 1.1 Introducción

Actualmente, uno de los principales objetivos en el área de la salud es comprender a profundidad el desarrollo y comportamiento de diferentes enfermedades para diseñar mejores tratamientos y fármacos que permitan obtener resultados favorables en los pacientes. Los estudios tradicionales como cultivos en 2D y modelos animales no son representativos de la fisiología humana. Por lo tanto, se han desarrollado alternativas que puedan emular el comportamiento de tejidos y órganos humanos *in vivo*, como los cultivos en 3D (*organ-on-a-chip*, esferoides, etc.)<sup>1-5</sup>. En los últimos años los sistemas de cultivo en modelos de *organ-on-chip* han captado la atención por la posibilidad de recrear el funcionamiento de órganos en un sistema controlado. El uso de diferentes tipos celulares en plataformas microfluídicas permite controlar y modificar las condiciones requeridas para evaluar la respuesta celular ante diferentes estímulos y estudiar con detalle cada proceso celular<sup>6</sup>. Por esta razón, este tipo de plataformas han ganado popularidad y representan un acercamiento para la medicina personalizada.

En México, el cáncer representa la tercera causa de mortalidad en mujeres mayores a 40 años, siendo el cáncer de mama el más común y por lo tanto, un problema de salud pública<sup>7</sup>. El cáncer de mama es una prioridad de salud establecida en países desarrollados; sin embargo, en los países en vías de desarrollo no se ha prestado suficiente atención a este problema sanitario. Hoy en día el cáncer de mama es una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres en países en vías de desarrollo. La mortalidad a causa de esta enfermedad es más alta en poblaciones de medios-bajos recursos (64-75 %) y menor en poblaciones más desarrolladas (46 %). El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en mujeres alrededor del mundo, con aproximadamente 1.38 millones de diagnósticos anuales<sup>8-10</sup>. Por lo tanto, es sumamente importante comprender detalladamente los procesos que provocan el avance e invasión en este tipo de cáncer.

Es necesario estudiar detalladamente el papel del microambiente tumoral y, para esto, debemos comprender la interdependencia entre los factores asociados y la activación de la señalización. Actualmente, hay modelos en 2D o xenoinjertos en animales; sin embargo, el estudio en este tipo de sistemas se vuelve muy complejo y costoso. Por lo tanto, es de interés desarrollar sistemas que permitan evaluar adecuadamente los procesos que se llevan a cabo con el desarrollo de la enfermedad

y que permitan evaluar nuevos fármacos para el desarrollo de tratamientos eficientes. Los sistemas de *cancer-on-chip* nos brindan una alternativa para estudiar las interacciones multicelulares *in vitro*. Sin embargo, actualmente la mayoría de los diseños monitorean diversos factores en punto final por el tipo de sensores que se pueden utilizar y por los análisis que implican tiempos prolongados en soluciones complejas. En este punto recae la importancia de diseñar sistemas totalmente integrados que permitan llevar a cabo el monitoreo celular en tiempo real<sup>11,12</sup>.

Actualmente, los sensores electroquímicos resultan atractivos por su infraestructura de bajo costo, sus tiempos de respuesta rápidos, la simplicidad operacional y la naturaleza robusta de las mediciones electroquímicas. Sin embargo, su integración en los sistemas *organ-on-a-chip* se realiza usualmente en sistemas complejos para el monitoreo de factores como el pH, oxígeno, glucosa, lactato, etc., que brindan información sobre el metabolismo celular. En particular el monitoreo de glucosa es de gran interés, por su importancia como fuente de energía celular, en el monitoreo de diabetes y su relevancia en el crecimiento de células cancerígenas<sup>13-16</sup>. Adicionalmente, puede brindar información sobre la proliferación y viabilidad celular<sup>17-24</sup>, citotoxicidad, estimulación de receptores<sup>25</sup>, daño mitocondrial<sup>4,20</sup>, etc. La integración de los biosensores electroquímicos es relativamente sencilla en comparación con otros métodos; sin embargo, el monitoreo continuo en medios complejos (medio de cultivo celular, muestras de sangre, orina, sudor, etc.) repercute en la estabilidad del biosensor. Por lo tanto, el objetivo principal es el diseño de biosensores estables para este tipo de plataformas<sup>26</sup>.

En este trabajo se desarrolla un biosensor electroquímico enzimático para monitorear glucosa en medios de cultivo celular en una plataforma microfluídica. El proyecto representa la primera etapa de un desarrollo cuya finalidad es tener una plataforma de cáncer de mama *on-a-chip* para evaluar diferentes tratamientos en muestras de pacientes. Sin embargo, por la complejidad del mismo, es necesario caracterizar cada elemento para monitorear los metabolitos de interés y diseñar una plataforma microfluídica que permita la integración de todos los elementos.

## 1.2 Justificación

En los últimos años ha crecido el interés para desarrollar sistemas que permitan estudiar los aspectos de la fisiología humana *in vitro*. Uno de los objetivos principales es el estudio de enfermedades y el diseño de nuevos tratamientos. Para esto, es necesario dividir sistemas complejos en secciones más sencillas. De esta manera es factible llevar a cabo análisis para comprender con detalle el comportamiento celular y los metabolitos involucrados. En nuestro caso, el objetivo principal del proyecto final es estudiar el microambiente tumoral en muestras de cáncer de mama, y una forma de evaluarlo es a través del metabolismo celular, poniendo nuestra atención en las moléculas relacionadas con este (oxígeno, glucosa, lactato, quimiocinas, citocinas etc.) y en técnicas capaces de detectarlas. Los sistemas *organ-on-chip* son clave para el desarrollo de modelos que permitan evaluar en tiempo real el comportamiento celular, que propicien el análisis detallado de las enfermedades y la evaluación de nuevos fármacos, factores que incrementan la posibilidad para diseñar nuevos tratamientos, y que a su vez puedan ser monitoreados de manera específica para cada paciente. Actualmente estos modelos representan una inversión millonaria y cada vez surgen más empresas enfocadas con este objetivo, algunos ejemplos son *Emulate*, *inSphero*, *Elveflow*, *Mimetas*, *MesoBiotech*, etc. Aunado a esto, es necesaria la integración de técnicas novedosas que permitan la manipulación controlada de las células y el análisis de las mismas. De este modo será posible contrarrestar las limitaciones en el análisis y evaluaciones en tiempo real. Actualmente, muchos de los procedimientos se realizan fuera del chip y en momentos específicos. Por lo tanto, la integración de sensores en las plataformas de cultivo es de suma importancia para incrementar la sensibilidad y resolución en el estudio del metabolismo celular<sup>27,28</sup>.

Los sensores electroquímicos han tenido gran impacto en las últimas décadas; las modificaciones de electrodos permiten la detección de una gran variedad de analitos a través de estrategias amperométricas o potenciométricas, con el uso de pequeños volúmenes para las evaluaciones. Un punto clave en el diseño de los biosensores electroquímicos enzimáticos es la inmovilización de enzimas en las superficies de los electrodos, factor que determinará la complejidad del sistema, la sensibilidad y selectividad para la detección de componentes traza en sistemas biológicos, clínicos, industriales o ambientales<sup>29</sup>. Por lo tanto, es necesario diseñar sensores electroquímicos estables y con la capacidad de ser integrados en diferentes plataformas de cultivo celular, que puedan funcionar en modelos continuos y dinámicos para evaluar diferentes escenarios del comportamiento celular.

### 1.3 Hipótesis

Los biosensores electroquímicos enzimáticos de segunda generación OsBPEI/GOx/GA y OsBPEI/GOx/EGDGE presentarán mayor sensibilidad, selectividad y estabilidad en el monitoreo de glucosa en sistemas microfluídicos de cultivo celular en comparación con los biosensores de primera generación BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE. Esto será debido a la eficiencia en la transferencia de electrones por el mediador Os y el uso de menores potenciales para la detección de glucosa.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar dos agentes entrecruzadores EGDGE y GA en el diseño de biosensores electroquímicos enzimáticos de primera y segunda generación, para determinar la mejor composición de un biosensor electroquímico enzimático para monitorear glucosa en medios de cultivo celulares.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar las condiciones de cultivo de las líneas celulares MCF-7, RAW 264.7, ECL-1, ECL-2, DSG-BC-1, DSG-BC-2, EA.hy 926 y la formación de esferoides con las líneas celulares MCF-7, ECL-2 y DSG-BC-2.
- II. Diseñar y fabricar un dispositivo microfluídico para modelar un sistema en 3D de cultivo celular que permita la interacción de diferentes líneas celulares.
- III. Cultivar líneas celulares en el dispositivo microfluídico.
- IV. Caracterizar biosensores enzimáticos de primera generación BPEI/GOx/EGDGE y BPEI/GOx/GA con dos diferentes entrecruzadores EGDGE/GA para monitorear glucosa en medios de cultivo celular.
- V. Caracterizar biosensores enzimáticos de segunda generación (OsBPEI/GOx/EGDGE y OsBPEI/GOx/GA) con dos diferentes entrecruzadores (EGDGE/GA) para monitorear glucosa en medios de cultivo celular.
- VI. Seleccionar el biosensor enzimático más adecuado para monitorear los niveles de glucosa en medios de cultivo celular.
- VII. Integrar el biosensor electroquímico enzimático en el dispositivo microfluídico para monitorear glucosa en tiempo real.

# CAPÍTULO II

## CULTIVO CELULAR

## Capítulo II – Cultivo Celular

Es importante comprender la complejidad de la fisiología humana y el desarrollo de diferentes enfermedades. Actualmente, se emplean modelos de cultivo celular en 2D o modelos animales; sin embargo, la trazabilidad de los resultados en los modelos con respecto al objetivo real, presentan variaciones significativas y no son representativos de la fisiología celular humana<sup>1-3,30,31</sup>. Es necesario el desarrollo de tecnologías que permitan emular la fisiología humana, estudiar enfermedades y probar medicamentos y tratamientos en sistemas representativos. Recientemente las plataformas de cultivo en 3D han ganado popularidad porque pueden representar la fisiología de tejidos y órganos<sup>4,5,30</sup>. Adicionalmente, el uso de plataformas microfluídicas en los sistemas de cultivo celular, permite controlar y modificar las condiciones químicas y físicas para estudiar la respuesta celular ante estímulos específicos<sup>6</sup>. Sin embargo, al incrementar la complejidad de los sistemas, incrementa la demanda de herramientas de evaluación y monitoreo. Un punto clave es la integración de sensores para evaluar continuamente las condiciones celulares<sup>32-34</sup> y preservar la viabilidad, el crecimiento y las funciones celulares.

### 2.1 Cultivos celulares en 2D

Los cultivos celulares en 2D replican el comportamiento de órganos o tejidos de manera limitada<sup>35</sup>. Son cultivos celulares que se adhieren a superficies planas, como cajas Petri, vidrio, etc., creando monocapas. Con el crecimiento en monocapas las células tienen acceso a concentraciones similares de nutrientes y factores de crecimiento, generando así, un crecimiento homogéneo. Son simples, su costo es bajo, los modelos están estandarizados y son más reproducibles en comparación con los cultivos en 3D<sup>31</sup>. Se han utilizado popularmente como modelos *in vitro* para estudiar la respuesta celular ante diferentes estímulos. Sin embargo, el crecimiento en monocapas también genera algunos efectos negativos. Modifica la forma de las células y la interacción entre ellas, en consecuencia, su actividad (diferenciación, proliferación, expresión de genes y proteínas, respuesta ante estímulos, metabolismo, señalamiento, etc.); por lo tanto, no son representativos de las respuestas *in vivo*<sup>31,36,37</sup>. Otro factor en estos modelos es que usualmente son monocultivos y no es posible estudiar la interacción de diferentes líneas celulares simultáneamente<sup>31</sup>, limitando la investigación de respuestas más complejas.

## 2. Cultivos celulares en 3D

Los cultivos celulares en 3D representan la estructura tridimensional que caracteriza a los tejidos y órganos; de esta manera, las células pueden organizarse, diferenciarse y comunicarse como lo harían *in vivo*<sup>38</sup>. En este sentido, es posible emular características específicas de tejidos, interacciones celulares, gradientes, etc., que proporcionan información fisiológica relevante para la investigación de mecanismos celulares y enfermedades, ingeniería de tejidos y medicina personalizada<sup>39</sup>.

Los modelos de cultivo celular en 3D ganaron popularidad por su capacidad para analizar sistemas *in vitro* de manera más precisa y mostrando más propiedades organotípicas que los sistemas en 2D. Sin embargo, en este tipo de sistemas hay dos dificultades principales. Debido al número de células en el sistema ( $10^3$  en comparación con  $10^4$ - $10^6$  de los sistemas en 2D) los cambios en las concentraciones son pequeños y los gradientes son menos homogéneos y multidireccionales. Esto implica la necesidad de sensores con alta sensibilidad y estables por largos periodos. Sin embargo, con la integración de técnicas microfluídicas es posible reducir los volúmenes y así, incrementar los cambios en las concentraciones. Se han desarrollado numerosos sistemas microfluídicos de cultivos en 3D, pero pocos incluyen sensores para medir los metabolitos celulares en tiempo real que permitan obtener información relevante del comportamiento celular<sup>28</sup>. Recientemente, muchos grupos de investigación han desarrollado modelos microfluídicos en 3D de diversos tejidos. Así mismo, las evaluaciones en el área oncológica han ganado relevancia, con el objetivo de comprender a profundidad el desarrollo y progreso de la enfermedad. Se han desarrollado modelos para analizar los factores del microambiente tumoral que influyen las respuestas tumorales ante terapias cancerígenas. Los primeros sistemas se enfocaron en puntos específicos del desarrollo de cáncer, incluyendo el progreso, el crecimiento, la expansión y angiogénesis. Por ejemplo, en un modelo de cáncer pulmonar, las células cancerígenas fueron expuestas a un fármaco anticancerígeno (tirapazamina) en un ambiente con diferentes gradientes de oxígeno, creados con un dispositivo microfluídico. Como resultado se incrementó la muerte de las células cancerígenas bajo condiciones de hipoxia. Este es un excelente ejemplo para mostrar cómo es posible tener control preciso sobre los gradientes de distintos metabolitos para entender a detalle los procesos que ocurren en el microambiente tumoral<sup>40,41</sup>.

Adicionalmente, con este tipo de modelos se ha identificado que el cultivo de células normales (epiteliales, endoteliales, estromales, inmunes, etc.) y la matriz extracelular junto con células cancerígenas, promueve el crecimiento de varios tipos de cáncer. Por lo tanto, es factible controlar las

condiciones del medio para entender a detalle los factores que propician o detienen el crecimiento tumoral. Estas propiedades hacen que este tipo de sistemas sean prometedores para el análisis de fármacos o de la toxicidad de algunos compuestos antes de hacer pruebas en pacientes y con la posibilidad de manejar información personalizada<sup>28,42</sup>. Sin embargo, una de las mayores limitantes en este tipo de sistemas es la evaluación de los parámetros en tiempo real. Actualmente, muchos de los métodos de caracterización aún se realizan tomando muestras de los dispositivos para realizar las pruebas necesarias, por lo tanto, el punto crucial para el progreso de estos sistemas es la integración de biosensores para el análisis continuo y no invasivo de los parámetros de interés<sup>40,41</sup>.

### 2.2.1 Esferoides

Los esferoides son el resultado del crecimiento y la agregación de uno o varios tipos celulares (células de tejidos o líneas celulares), capaces de crecer y proliferar. Es posible que presenten respuestas fisiológicas, pero no se observa en ellos diferenciación u organización celular. De acuerdo con la tendencia natural de las células para organizarse en agregados en la ausencia de un sustrato adhesivo, los esferoides son capaces de representar un ambiente *in vivo* debido al incremento de contacto entre células, la orientación espacial adecuada y un incremento en la producción de ECM dentro del agregado celular. En general, retienen las características de las células iniciales, pero asumen una forma esférica. En el caso de modelos tumorales, los esferoides pueden ser cultivados a partir del tejido de pacientes, lo que hace posible el tratamiento personalizado<sup>12,43</sup>.

Es importante mencionar que el crecimiento de células en 3D es más complicado que los métodos de cultivo en monocapas. Sin embargo, el crecimiento de esferoides puede lograrse con el uso adecuado de las herramientas y métodos disponibles. Actualmente, han ganado popularidad en modelos tumorales. Se ha evaluado el uso de células cancerígenas en esferoides para analizar el comportamiento entre célula-célula y célula-matriz celular en el microambiente tumoral. Si el sistema es capaz de representar las interacciones celulares y se propicia un crecimiento adecuado, es factible analizar los gradientes de nutrientes, de oxígeno, pH y, por ende, el metabolismo celular<sup>40,41</sup>. Los esferoides de células tumorales representan sistemas de estudio *in vitro* del crecimiento de tumores en su microambiente. Con estos modelos es posible tomar células de diferentes regiones del agregado y estudiar las diferencias de clonogenicidad, el estado del ciclo celular y la respuesta a fármacos. Cuando se disocian pueden ser estudiados por citometría de flujo, lo cual facilita conocer los efectos de gradientes de oxígeno y el impacto que presentan con variaciones de nutrientes (Figura 1). Este tipo de agregados permite la evaluación de la toxicidad de fármacos, especialmente con respecto a la

penetración al centro de la estructura. Tienen un importante rol en estudios avanzados de la fisiología celular y cáncer<sup>43</sup>. Es posible integrarlos en plataformas organ-on-a-chip a partir de líneas celulares o muestras de pacientes; sin embargo, también es factible disociarlos una vez que han adquirido las características deseadas para ser integrados en diferentes modelos de cultivo.

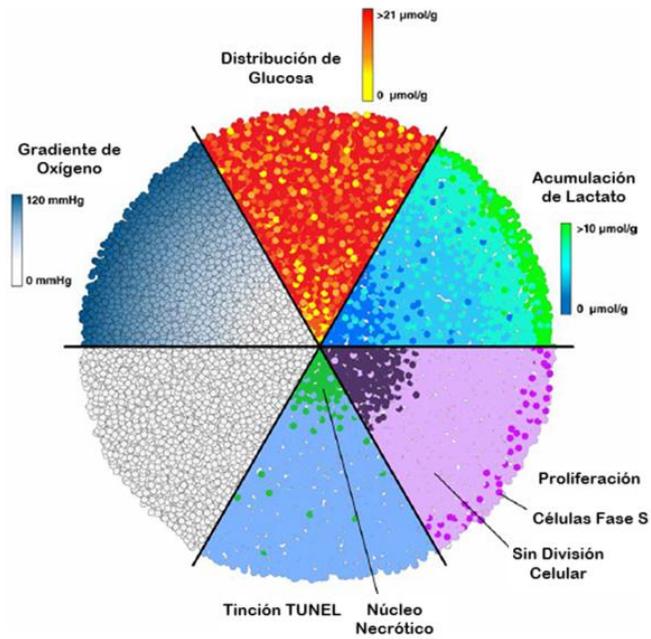


FIGURA 1. Zonas de un esferoide. En este tipo de estructuras los niveles de oxígeno y la disposición de nutrientes es diferente en el núcleo y en la superficie, por lo tanto, la viabilidad de las células y su comportamiento varía según su ubicación<sup>43</sup>.

## 2.2.2 Organ-on-a-chip

Son dispositivos microfluídicos diseñados para el cultivo celular en 3D y creados por métodos de microfabricación que facilitan el diseño de cámaras conectadas para el cultivo de diferentes tipos celulares que simulan la fisiología de tejidos u órganos. De esta manera es posible simular la arquitectura multicelular, las interfases entre tejidos, el microambiente fisicoquímico y la perfusión vascular; características que no son posibles de desarrollar en los sistemas convencionales. Se caracterizan por una alta resolución, es posible realizar análisis en tiempo real y estudios *in vitro* de factores bioquímicos, genéticos y metabólicos en un contexto similar al ambiente de tejidos/órganos. Por otra parte, facilitan la evaluación de fármacos y el diseño de nuevos tratamientos con el estudio de mecanismos de acción molecular, evaluaciones de toxicidad y la identificación de biomarcadores<sup>44</sup>. Actualmente hay diversos dispositivos que representan una gran variedad de órganos y

enfermedades. En el caso de los modelos de *cancer-on-a-chip* se han logrado grandes avances en la evaluación de los procesos que ocurren en el microambiente tumoral para entender el desarrollo tumoral y evaluar distintos fármacos.

Estos dispositivos son elaborados generalmente con materiales transparentes o traslúcidos como plásticos (polimetilmetacrilato-PMMA), vidrio o polímeros flexibles (polidimetilsiloxano-PDMS) para facilitar el análisis. Es posible crear diseños simples o de gran complejidad con cámaras conectadas por microcanales. Estas características facilitan el cultivo de diferentes líneas celulares, la recreación del microambiente celular y las estructuras entre tejidos y órganos. Es posible crear diseños complejos con múltiples líneas celulares, las cuales pueden estar en contacto a través de membranas porosas o hidrogeles. Actualmente es factible mantener los sistemas por periodos prolongados (semanas a meses) al incorporar el flujo de medios de cultivo específicos<sup>42</sup>. De esta manera, tienen el potencial para la integración funcional con otras tecnologías y su miniaturización. Sin embargo, al miniaturizar los sistemas aumenta la complejidad de estos<sup>45</sup> y por lo tanto, es fundamental elaborar un diseño que permita aprovechar las ventajas que estos sistemas nos ofrecen, como el uso de volúmenes pequeños de muestras y reactivos, tiempos cortos para el análisis, disminución de desperdicios, alta sensibilidad, selectividad y la posibilidad de evaluar sistemas celulares en tiempo real. Como resultado, el desarrollo de estos dispositivos ha tenido un crecimiento acelerado en los últimos años<sup>46</sup>.

## 2.3 Metodología

### 2.1 Cultivo de líneas celulares

Las células utilizadas en los cultivos celulares derivan de múltiples fuentes, como líneas celulares (repositorios), células primarias y células de donantes. Las células pueden proliferar indefinidamente si las condiciones de cultivo son apropiadas. En el caso de las líneas celulares de cáncer, los cultivos utilizados son homogéneos; por tal motivo es importante tomar precauciones para evitar cambios en el genotipo. El cultivo continuo y prolongado puede afectar el genotipo a largo plazo y, por lo tanto, el fenotipo y la función de las células. De esta manera, es recomendable iniciar con un bajo pasaje del número de cultivos en los experimentos<sup>43</sup>.

Por otra parte, es importante considerar que los modelos de cultivo en 3D pueden utilizar sistemas dependientes o independientes de una matriz (biológica o sintética). Los modelos dependientes se utilizan para facilitar la transición de los modelos 2D a los modelos 3D. Por su parte, los modelos

independientes son utilizados para escalar los modelos o desarrollar modelos más complejos. Las matrices son utilizadas porque forman un microambiente muy parecido al microambiente celular; permiten un comportamiento celular adecuado (crecimiento, señalización, migración, proliferación, diferenciación, comunicación, etc.). Adicionalmente, los sistemas dependientes brindan soporte estructural a las células, facilitan la preservación de la arquitectura biológica, promueven la función biológica normal y mantienen los sitios de unión con integrinas. Por el contrario, en los sistemas independientes se proveen las condiciones para que las células sean capaces de crear su propia ECM<sup>43</sup>.

El trabajo descrito a continuación se realizó en el Laboratorio del Dr. Alejandro Zentella Dehesa, en la Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, ubicado en la unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Las líneas celulares MCF-7, RAW 264.7 y MDA-MB-31 que fueron utilizadas en el procedimiento descrito a continuación, se adquirieron del ATCC (*American Type Culture Collection*). Las líneas celulares ECL-1, ECL-2, DSG-BC-1 y DSG-BC-2 fueron establecidas en la unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) por el grupo de investigación del Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Adicionalmente, la Mtra. Gabriela Guadarrama del Laboratorio de Biología de la Reproducción donó cultivos de la línea celular EA.hy 926.

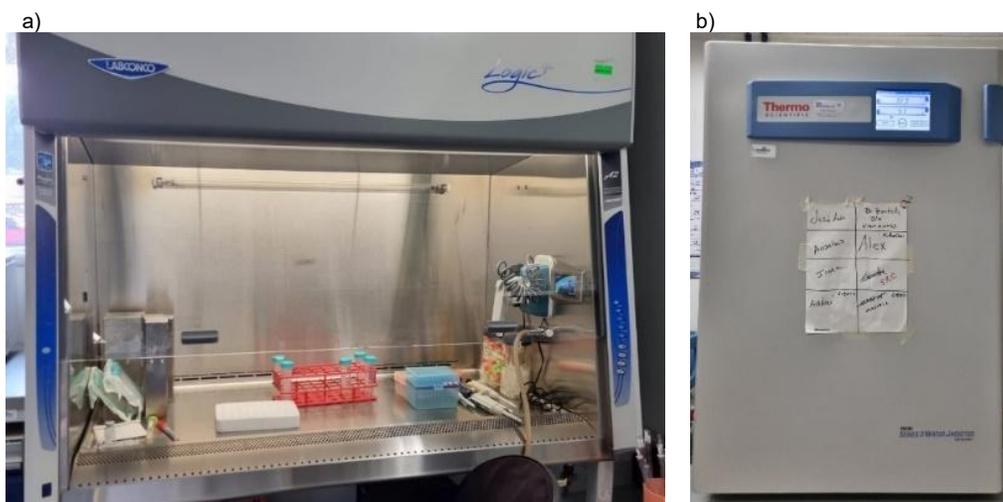


Figura 2. a) Campana de seguridad biológica nivel II con flujo laminar. b) Incubadora con control de CO<sub>2</sub>.

Las ocho líneas celulares fueron cultivadas y manipuladas en condiciones estériles dentro de una

campana de seguridad biológica nivel II (Figura 2), tipo A2, con flujo laminar (Labconco / Purifier Logic<sup>+</sup> / Estados Unidos). Posteriormente, todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Thermo Scientific Series 3 Water Jacketed / modelo 4110 / Estados Unidos) bajo condiciones controladas a 37 °C, presión parcial de CO<sub>2</sub> del 5 % y una atm de 100 % de humedad relativa. Los medios de cultivo fueron retirados de refrigeración y colocados en baño María a 37 °C por 5 min. Posteriormente cada frasco fue lavado con etanol 98 % antes de colocarlo en la campana de flujo laminar.

Todos los procedimientos se realizaron con material estéril, incluyendo:

- Puntas de micropipeta para 200-1000 µl
- Pipetas graduadas de borosilicato de 2, 5 y 10 ml
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Cajas Petri de poliestireno para cultivo celular (pretratadas para promover adherencia) con 10 cm de diámetro.
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 y 50 ml
- Crioviales de polipropileno de 2 ml
- Tubos *ependorf* de polipropileno 1.5 ml
- Frascos de poliestireno para cultivo celular (25 cm<sup>2</sup>)
- Microplacas de poliestireno con 96 pocillos (adherencia ultra baja para minimizar la adhesión celular).

### 2.3.2 Valoración y elaboración de subcultivos

Para cada línea celular se realizó el siguiente procedimiento:

Descongelamiento: Se seleccionan las líneas celulares de interés y se toman crioviales del ultracongelador (-70 °C). Se colocan en baño maría a 37 °C por 4 min. Es importante considerar que el agua no debe tocar la tapa del criovial. Posteriormente se rocían con etanol al 70 % y se colocan en la campana de flujo laminar. Se toma el contenido del criovial, se coloca en un tubo cónico de 50 ml y se resuspenden en el medio de cultivo designado. Se centrifuga por 3 min con 1500 rpm, se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 10 ml de medio fresco. Finalmente se agita por inmersión y se coloca en una caja Petri en la incubadora a 37 °C.

Valoración visual: Como primer punto, se analizan los cultivos celulares utilizando un microscopio

óptico invertido de contraste de fases (Nikon TMS-F /#211710/Japón) con 40X de magnificación óptica. En la valoración se determina la densidad celular entre el 25 - 100 % de confluencia (referente al % de crecimiento celular con respecto al área de cultivo, porcentajes de crecimiento mayores al 80 % no son adecuados para la proliferación celular), estado de proliferación (número de figuras mitóticas y células “brillantes”) y si hay o no muerte celular (presencia de detritus celular y células “oscuras”). Esta información determinará las acciones a realizar con el cultivo.

Expansión: La expansión implica mantener un cultivo en condiciones tales que permitan la proliferación celular continua con el ánimo de generar un gran número de células. Si el cultivo celular ha alcanzado una densidad mayor al 50 % es necesario realizar el siguiente procedimiento para tener un cultivo adecuado:

- Retirar el medio de cultivo por aspiración con una pipeta Pasteur.
- Se agrega 1 ml de una solución de tripsina-EDTA asegurándonos que cubra toda la superficie. La solución se deja por 1 min, se evalúa si las células aún no se han despegado de la superficie. Si las células no se han despegado se coloca por 1 min en la incubadora a 37 °C. Se observa en el microscopio si las células se han despegado de la superficie, es importante observar células únicas, sin grumos.
- Se detiene la reacción agregando 1 ml del medio de cultivo adecuado para cada línea celular con 10 % SFB. Se colecta el medio y se coloca en un tubo cónico de polipropileno de 50 ml. Se agregan nuevamente 2 ml de medio de cultivo en la caja Petri para recolectar las células restantes y se colocan en el tubo.
- La solución se coloca en una centrífuga por 5 min a 1500 rpm.
- Posteriormente se retira el sobrenadante por aspiración y se disuelve completamente el pellet en 500 µl de medio fresco. Se agrega el volumen de medio necesario de acuerdo con los procedimientos a realizar.
- Si se requiere realizar un subcultivo, se toma el volumen necesario para obtener la concentración celular deseada y se agrega en 10 ml de medio de cultivo. Se agita por inmersión y se coloca en una caja Petri o en una microplaca de cultivo (agregar la muestra en cruz para evitar corrientes y obtener un depósito uniforme). A continuación, el acarreador se coloca en la incubadora a 37 °C.
- Si se requiere tener una reserva de la línea celular, se toma el volumen requerido y se coloca en un tubo de polipropileno de 50 ml, se centrifuga por 5 min a 1500 rpm. Se retira el sobrenadante por aspiración y se agregan 500 µl de medio de cultivo suplementado con 5 % DMSO (Sigma Aldrich/D2650/Toluca, Edo. de México) hasta disolver el pellet. Se agrega el volumen necesario de

medio de cultivo suplementado con 5 % DMSO para obtener una concentración celular adecuada. Finalmente, se preparan crioviales de congelación con 1 ml de la solución y se colocan en congelación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Ultracongelador Thermo Scientific/serie TSU/USA).

- Si se requiere realizar el cultivo para la formación de esferoides, se toma el volumen requerido para tener una concentración celular de  $5 \times 10^4$  células/250  $\mu\text{l}$ . Se utiliza una microplaca de ultra baja adherencia para el procedimiento y se colocan 250  $\mu\text{l}$  por pocillo. Es importante no tocar el fondo del pocillo durante el depósito.

Si se observa un porcentaje mayor al 10 % de muerte celular o células no adheridas es necesario cambiar el medio de cultivo. Se retira por aspiración con una pipeta Pasteur y se agregan 10 ml de medio fresco. En cambio, si se observa una densidad celular menor al 25 % y proliferación celular mayor al 5 % no se realiza ninguna acción. Finalmente, los cultivos se colocan nuevamente en la incubadora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Valoración de la línea celular EA.hy 926

Las células vasculares endoteliales son las encargadas de mediar interacciones entre células sanguíneas y las paredes vasculares, tienen un rol importante en varios procesos fisiológicos y patológicos. Se emplean en modelos de cultivo para estudiar procesos inflamatorios, angiogénesis, cicatrización de heridas, crecimiento de tumores, metástasis, entre otros. Las líneas celulares inmortalizadas son muy convenientes para evaluar estos procesos, debido a que pueden ser cultivadas en grandes cantidades y no se pierde la viabilidad con su propagación<sup>47</sup>. La línea celular EA.hy 926 es una línea celular inmortalizada, una fusión de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) con la línea celular de carcinoma pulmonar humano (A549). Conserva muchas de las características de las células endoteliales, actualmente está ampliamente caracterizada y es utilizada en evaluaciones de procesos fisiológicos, patológicos y de angiogénesis. Generalmente es cultivada en medios como DMEM o RPMI 1640 y suplementada con SFB 10 %, L-glutamina (2 mM), estreptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), penicilina (U/ml). Su crecimiento se realiza en condiciones controladas con  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$ <sup>47,48</sup>.

El cultivo celular de la línea celular EA.hy 926, se encontraba en el pase 3 (Figura 3) y crecía en una mezcla de DMEM/F12 (Sigma Aldrich/D9785/Toluca, Edo. de México), suplementado con 5 % de SFB

(Sigma Aldrich/F2442/USA). Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.2.2 para expandir la línea celular con medio de cultivo RPMI 1640. Al analizar la muestra 24 h después se observó:

- Densidad: Se observó una densidad celular aproximada del 25 % (Figura 4).
- Proliferación: Buen estado proliferativo > 5 % de figuras mitóticas, adicionalmente se identificó un alto porcentaje de células brillantes (Figura 4).
- Muerte celular: Se observó muerte celular escasa sin detritus celular (Figura 4)
- Adicionalmente, las células presentan en sus extremos estructuras globulares que podrían ser indicativas de infección por micoplasma (Figura 4).

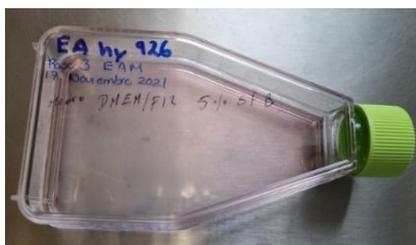


Figura 3. Botella de cultivo de 78 cm<sup>2</sup> con tapa con filtro incorporado. Cultivo de células EA.hy 926 en medio DMEM/F12 suplementado con 5 % de SFB.



Figura 4. Micrografía del cultivo celular EA.hy 926. Imagen de contraste de fases a 40X, se muestran dos campos representativos del cultivo correspondiente a la Figura 3.

Con base en estas observaciones, se consideró dar más tiempo para que el cultivo pueda proliferar y ser empleado en evaluaciones posteriores.

## 2.4.2 Valoración de la línea celular RAW 264.7

La línea celular RAW 264.7 es de monocitos/macrófagos derivada de tumores inducidos en ratones macho BALB/c por el virus de leucemia murino *Abelson*. Se ha comprobado que son un modelo apropiado de macrófagos. Son capaces de llevar a cabo pinocitosis, fagocitosis, conservan la motilidad, son capaces de identificar y eliminar algunas células por citotoxicidad dependiente de anticuerpos<sup>49,50</sup>. Es importante considerar que los macrófagos son encontrados en todos los órganos y tejidos del cuerpo; sin embargo, su fenotipo varía de acuerdo con su estado fisiológico. Los macrófagos son muy sensibles a las condiciones ambientales y son capaces de adaptarse rápidamente a nuevos estímulos (citocinas, marcadores, etc). Se clasifican en M1 (son activados por LPS, INF- $\gamma$  y son células proinflamatorias) y M2 (son activados por IL-4, IL-10 y son células antiinflamatorias)<sup>49</sup>.

Las células RAW 264.7 se adhieren a los platos convencionales de cultivo por los receptores de integrinas dependientes de cationes. Son extremadamente sensibles a endotoxinas de lipopolisacáridos de bacterias gram negativas, por lo tanto, es sumamente importante utilizar únicamente soluciones estériles. El manejo de esta línea celular debe realizarse en un área estéril. El vial que contiene la línea celular debe sumergirse en etanol 70 % antes de descongelar. Posteriormente se descongela el vial y se toma la cantidad necesaria para inocular el medio de cultivo. Es recomendable resuspender las células en medio fresco y centrifugar por 3 min a 300 xg (para evitar cristales), desechar el sobrenadante y agregar medio fresco<sup>51</sup>. Es necesario calentar el medio de cultivo previamente por 15-20 min a 37 °C en baño maría y se coloca en un matraz. No se deben exponer las células a medio frío o movimientos bruscos, esto puede provocar muerte celular o el desprendimiento. No es recomendable manejar el cultivo por largos periodos fuera de la incubadora<sup>50</sup>. Por otra parte, es importante considerar que no deben realizarse más de 18 pasajes en esta línea celular para mantener la viabilidad y eficiencia (de acuerdo con la ATCC). Sin embargo, hay reportes que confirman su estabilidad hasta el pasaje 30<sup>49</sup>.

Se utilizan medios como DMEM, EMEM, RPMI 1640 etc., altos en glucosa con suplementos como FBS 10 % v/v, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomycinina 1 %<sup>49</sup>. El medio de cultivo debe cambiarse

cada 2-3 días. Es necesario retirar el medio del recipiente de cultivo y agregar gentilmente medio fresco. El tiempo promedio de duplicación de esta línea celular es de 15 h<sup>50</sup>. El cultivo se realiza con 37 °C, 95 % humedad y 5 % CO<sub>2</sub><sup>49,50</sup>. Una vez que las células se han adherido (6 h aproximadamente) es necesario retirar el medio y agregar medio de cultivo fresco. Una vez que las células han alcanzado una confluencia del 80 % es necesario realizar un pasaje<sup>49</sup> para evitar la muerte celular. Finalmente, es necesario realizar un conteo celular en este punto.

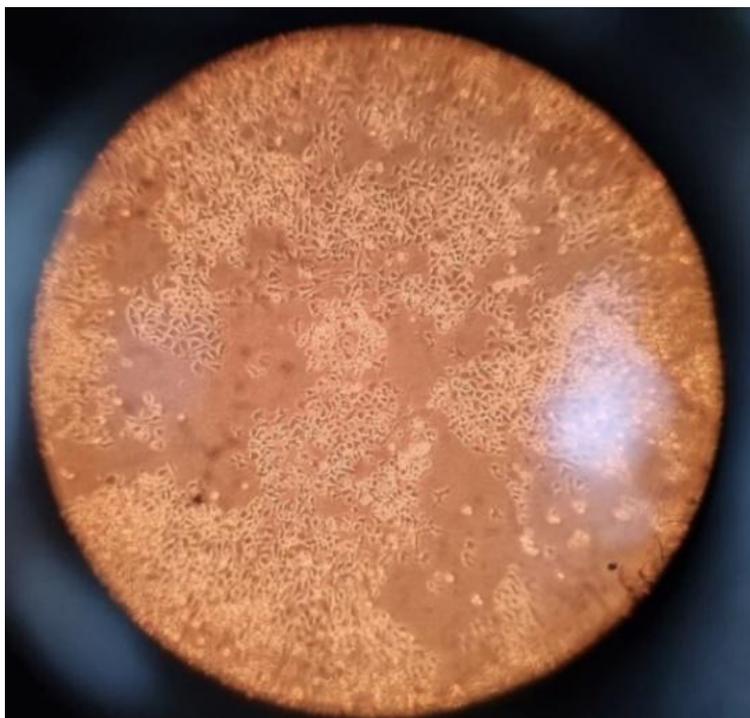


Figura 5. Micrografía del cultivo celular RAW 264.7. Imagen de contraste de fases a 40X.

El cultivo celular crecía en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma Aldrich/R6504/USA), suplementado con 10 % de SFB. El número de pase de cultivo no está identificado. Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.2.2 para expandir la línea celular con medio de cultivo RPMI 1640. Al analizar la muestra 24 h después se observó:

- Densidad: Se observó crecimiento parchado con zonas de crecimiento con una densidad celular aproximada del 100 % (Figura 5).
- Proliferación: Buen estado proliferativo > 5 % de figuras mitóticas y células brillantes. Sin embargo, es notorio que hay células mutantes (células con varios núcleos, células agigantadas), común en el cultivo de células cancerígenas (Figura 5).
- Muerte celular: Se observó muerte celular escasa sin detritus celular (Figura 5).

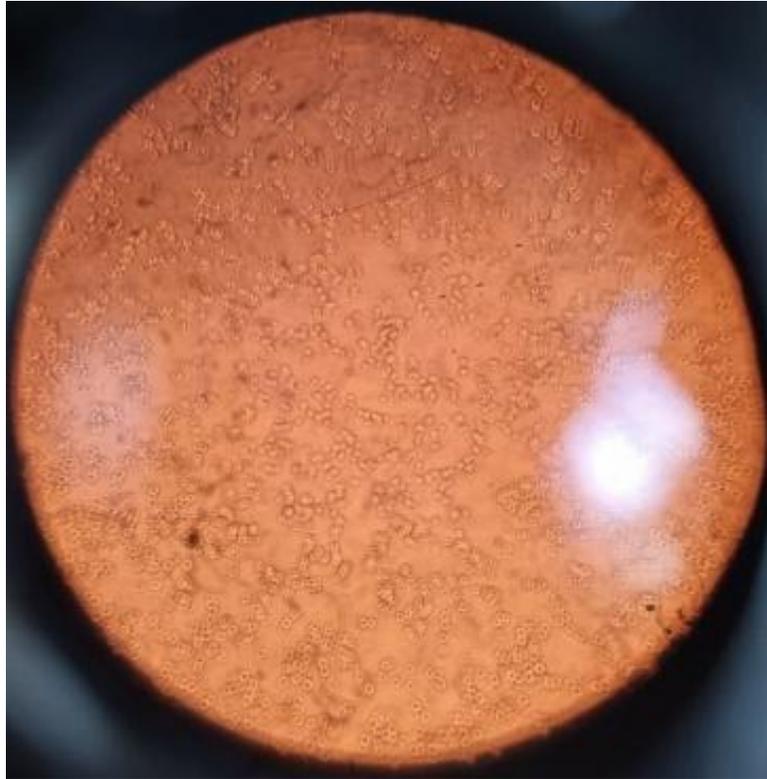


Figura 6. Micrografía del cultivo celular RAW 264.7 en la solución de tripsina-EDTA. Imagen de contraste de fases a 40X.

Con base en estas observaciones, se consideró realizar un subcultivo como se describe en la sección 2.2.2. En la Figura 6 se observan las células suspendidas en la solución de tripsina-EDTA. Posteriormente la solución es centrifugada y se obtiene el *pellet* de la línea celular (Figura 7), es resuspendido en medio fresco y se identifica el acarreador.



Figura 7. Formación del pellet del cultivo celular RAW 264.7.

### 2.4.3 Valoración visual de la línea celular MCF-7

El origen de la línea celular es de células epiteliales de la glándula mamaria de adenocarcinoma mamario. Tiene receptores de estrógeno, progesterona y receptores de glucocorticoides. Es ideal para el estudio de cáncer de mama porque mantiene características ideales que corresponden al epitelio mamario, como el procesamiento de estrógeno en forma de estradiol a través de los receptores de estrógeno en el citoplasma. Es una de las primeras líneas celulares capaces de responder a hormonas<sup>43,52</sup>.

Las células pueden ser cultivadas en medios con altas concentraciones de glucosa como DMEM, EMEM o RPMI 1640 (con o sin rojo fenol). Adicionalmente, es común el uso de suplementos (factores de crecimiento, citosinas, hormonas, etc.), que facilitan el crecimiento (el uso de estrógeno 10 nM incrementa el rango de crecimiento celular). Usualmente se utiliza 10 % FBS, 0.6 mg/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomycin, 1-2 mM de glutamina (utilizada en el ciclo de Krebs para obtener energía), 0.01 mg/ml de insulina, 1 mM de piruvato de sodio o 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, en este tipo de cultivos. Se consideran alrededor de  $5 \times 10^4$  –  $1 \times 10^6$  células para el cultivo inicial. Usualmente se realiza en platos de cultivo con bajos índices de adhesión (T25, T75). El cultivo se mantiene en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> con control de humedad<sup>11,43,52,53</sup>. La confluencia celular debe mantenerse entre el 30-90 %, es necesario evitar una concentración mayor al 90 % porque disminuyen los rangos de proliferación. Una vez que se ha alcanzado una confluencia entre el 70-80 % (crecimiento exponencial 30-40 h) en el cultivo es posible dividir las células por diversos procedimientos<sup>53</sup>.

Es necesario considerar que, en este tipo de cultivos celulares podemos enfrentarnos a problemas como:

- Baja viabilidad celular después de las evaluaciones, para lo cual debemos evitar el pipeteo brusco en el cambio del medio o durante las evaluaciones. O bien, considerar si las células han sido expuestas por tiempo excesivo al agente de disociación para despegarlas.
- Dificultad para despegar las células del plato de cultivo, para lo cual es posible utilizar concentraciones mayores de las soluciones o incubar a 37 °C con el agente de disociación para incrementar la actividad enzimática. Es importante lavar el plato de cultivo con PBS antes de agregar el agente de disociación, incluso con dos lavados si es necesario.

- Formación de aglomerados celulares: evitar niveles elevados de centrifugación y agitación de los platos de cultivo<sup>52,53</sup>.



Figura 8. Micrografía del cultivo celular MCF-7. Imagen de contraste de fases a 40X.

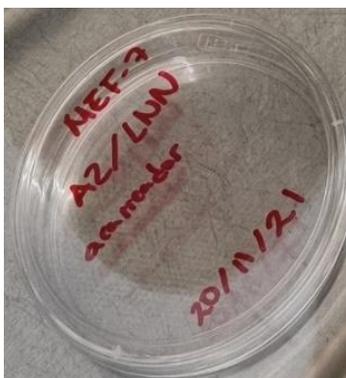


Figura 9. Caja Petri de poliestireno para cultivo celular (10 cm de diámetro) con el cultivo de la línea celular MCF.7.

El cultivo celular crecía en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10 % de SFB. El número de pase de cultivo no está identificado (Figuras 8-9). Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.2.2 para expandir la línea celular con medio de cultivo RPMI 1640. Al analizar la muestra 24 h después se observó:

- Densidad: Se observó una densidad celular aproximada del 100 % (Figura 8).
- Proliferación: Buen estado proliferativo > 5 % de figuras mitóticas y células refringentes (Figura 8).
- Muerte celular: Se observó muerte celular escasa sin detritus celular (Figura 8).

### 2.4.3.1 Valoración de esferoides generadas con la línea celular MCF-7

Para asegurar el crecimiento eficiente de los esferoides es importante inocular con la densidad celular apropiada y utilizar platos de cultivo optimizados para el crecimiento de estructuras en 3D. Este tipo de materiales tienen superficies con un nivel de adherencia muy bajo en comparación con los platos de cultivo tradicionales. Es posible formar esferoides cuando se permite que las células crezcan en suspensión y como resultado crecen en agregados. También es importante considerar un pipeteo delicado para cambiar el medio sin dañar la formación de las estructuras. Por lo tanto, se sugiere usar volúmenes grandes y cambiar la mitad del medio en lugar de cambiar el volumen total. Por otra parte, los esferoides pueden ser teñidos con una gran variedad de fluoróforos para examinar la localización y cantidad de moléculas en el cultivo, viabilidad, apoptosis, salud mitocondrial y otras funciones celulares<sup>43</sup>.

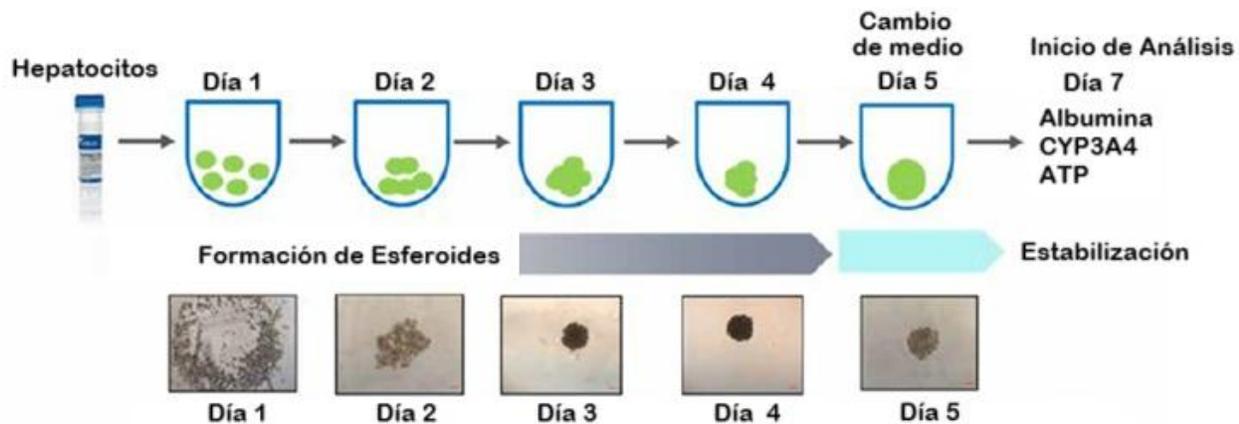


Figura 10. Formación de un único esferoide por pocillo a partir de células primarias de hepatocitos de humano. Los esferoides se forman en 5 días y pueden realizarse evaluaciones a partir del séptimo día<sup>43</sup>.

Es posible controlar la formación de un único esferoide por pocillo (Figura 10) o bien, la formación de múltiples esferoides en platos de cultivo más grandes. Es importante considerar que deben realizarse evaluaciones para determinar el estado y la viabilidad de los esferoides.

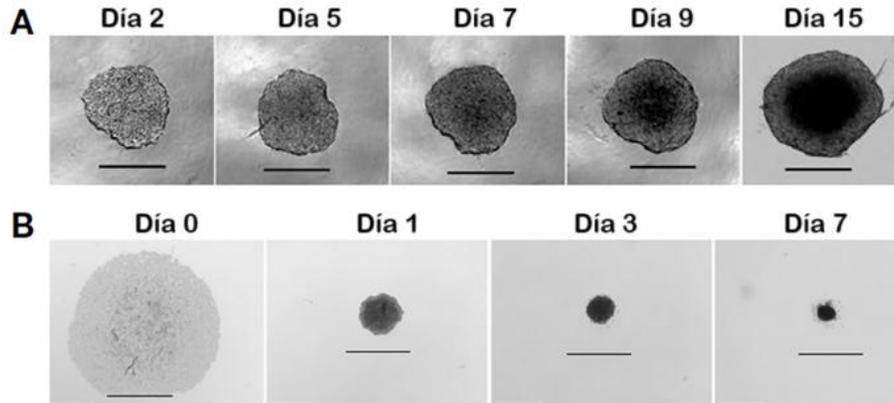


Figura 11. Se muestra la formación de esferoides a partir de dos tipos celulares. En la línea celular T47D (A) se observa un aumento de tamaño y el oscurecimiento de los núcleos, se considera un crecimiento ideal en el día 5. En el caso de la línea celular SKOV-3 (B) se observa una disminución de tamaño y la fragmentación de la estructura, se considera un crecimiento ideal en el día 1. Por lo tanto, es necesario estandarizar las condiciones para cada tipo celular <sup>43</sup>.

Las evaluaciones con microscopía óptica nos permitirán evaluar las condiciones y los tiempos más adecuados para la formación de las estructuras. Un esferoide ideal es traslucido con un borde bien definido y un centro oscurecido ligeramente. Se ha determinado que concentraciones bajas de colágeno I mejoran las estructuras de los esferoides. También se ha comprobado que las células que se cultivan en condiciones de hipoxia crecen más rápido, viven más y presentan menores rangos de estrés. Por lo tanto, idealmente su crecimiento se lleva a cabo en incubadoras con control de N<sub>2</sub> <sup>43</sup>.

Finalmente, es importante considerar que, de acuerdo con la línea celular utilizada, los esferoides pueden variar en el grado de compactación. Por lo tanto, es necesario estandarizar el procedimiento para tener tamaños uniformes (Figura 11). De acuerdo con la técnica utilizada se determinará la uniformidad en la forma y tamaño promedio de las estructuras. Es necesario determinar el grado de variaciones aceptables de acuerdo con el modelo a evaluar<sup>43</sup>.

Con base en las observaciones de la sección 2.3.3, se consideró realizar un subcultivo realizando el procedimiento descrito anteriormente en la sección 2.2.2. Una vez que las células fueron retiradas con la solución de tripsina-EDTA de la superficie de la caja Petri, son colocadas en un tubo de polipropileno con 4 ml de medio RPMI 1640 fresco, son centrifugadas por 5 min a 1500 rpm y posteriormente se agregan 5 ml de medio fresco RPMI 1640. Se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l para realizar el conteo celular en la cámara de Neubauer, obteniendo como resultado  $3.8 \times 10^6$  células/ml en el acarreador (Figura

12). Finalmente, se realiza el conteo para depositar  $5 \times 10^4$  células/250  $\mu$ l por duplicado en una microplaca de ultra baja adherencia para la formación de esferoides. En la Figura 12 se observan los cambios en el cultivo después de 48 h de incubación. Aún se observan agregados celulares, en donde sencillamente se identifican las divisiones celulares, el grado de compactación no se ha alcanzado para obtener un esferoide adecuado.

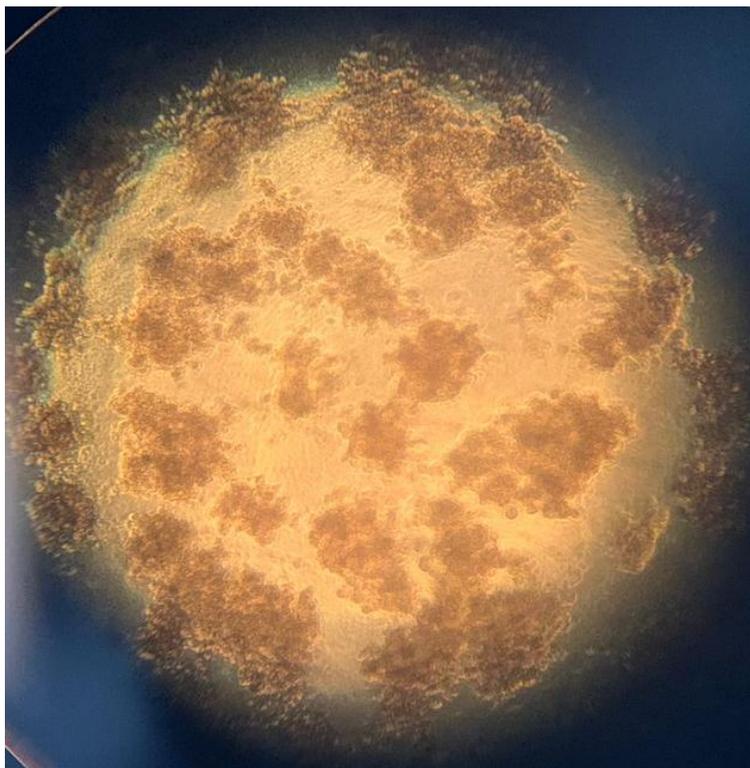


Figura 12. Micrografía de la formación de esferoides (48 h) con  $5 \times 10^4$  células/250  $\mu$ l con el cultivo celular MCF-7. Imagen de contraste de fases a 40X.

#### 2.4.4 Valoración visual de la línea celular DSG-BC-1

Línea celular de cáncer de mama primario humano triple negativo. La línea celular fue establecida de una paciente de 59 años del Centro de Cáncer ABC con carcinoma ductal invasivo de cáncer de mama triple negativo con un índice de masa corporal de  $21.9 \text{ kg/m}^2$ . Adicionalmente, la línea celular es capaz de invadir matrices de colágeno, indicativo de un fenotipo agresivo. Sin embargo, expresa bajos niveles del receptor de estrógeno. La línea celular se desarrolla adecuadamente en medios de cultivo como DMEM, DMEM/F-12 o RPMI 1640<sup>7</sup>.

El cultivo celular crecía en medio de cultivo CAMA (DMEM/F-12, glutamina, hidrocortisona, insulina, 5

% SFB, penicilina/estreptomicina, EGF, antifúngicos). El número de pase de cultivo no está identificado. Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.2.2 para expandir la línea celular con medio de cultivo RPMI 1640. Al analizar la muestra 24 h después se observó:

- Densidad: Se observó una densidad celular aproximada del 25 % (Figura 13).
- Proliferación: Buen estado proliferativo > 5 % de figuras mitóticas y células brillantes. (Figura 13).
- Muerte celular: Se observó muerte celular escasa sin detritus celular (Figura 13).

Con base en las observaciones, se colocó nuevamente en la incubadora a 37 °C para promover la proliferación celular.

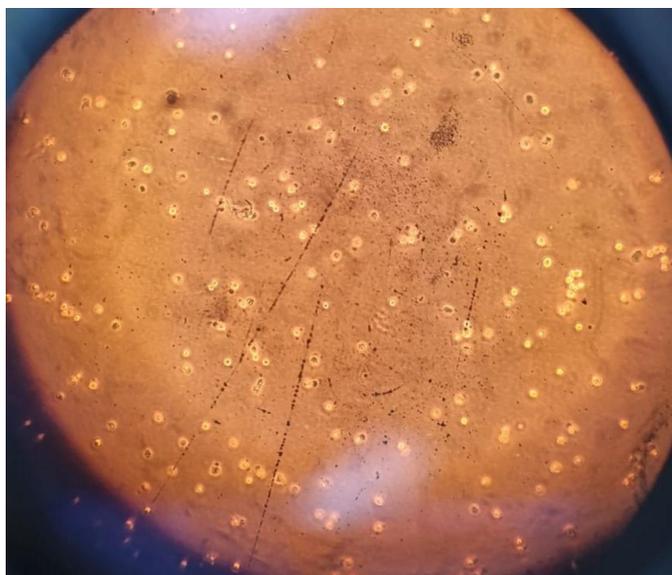


Figura 13. Micrografía del cultivo celular DSG-BC-1. Imagen de contraste de fases a 40X.

#### 2.4.5 Valoración visual de la línea celular DSG-BC-2

Línea celular de cáncer de mama primario humano triple negativo. La línea celular fue establecida de una paciente de 52 años del Centro de Cáncer ABC con carcinoma ductal invasivo de cáncer de mama triple negativo con un índice de masa corporal de 31.5 kg/m<sup>2</sup>, identificado como obesidad. Esta línea celular presenta una tasa mayor de proliferación, creciendo 1.92 veces más en comparación de la línea celular DSG-BC-1, relacionado con un crecimiento tumoral agresivo. Presenta una mayor motilidad y habilidad para inducir permeabilidad endotelial en comparación con la línea celular DSG-BC-1. Adicionalmente, la línea celular es capaz de invadir matrices de colágeno, indicativo de un

fenotipo agresivo. Sin embargo, expresa bajos niveles del receptor de estrógeno. La línea celular se desarrolla adecuadamente en medios de cultivo como DMEM, DMEM/F-12 o RPMI 1640 <sup>7</sup>.

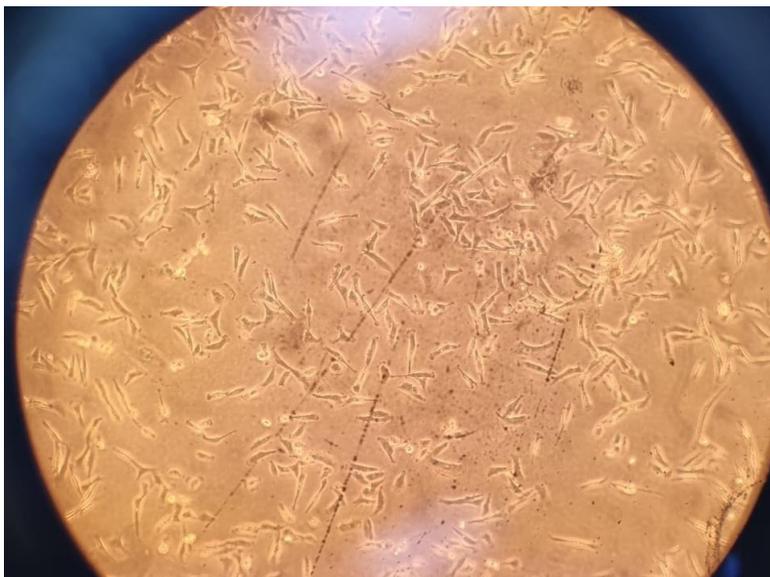


Figura 14. Micrografía del cultivo celular DSG-BC-2. Imagen de contraste de fases a 40X.

El cultivo celular crecía en medio de cultivo CAMA. El número de pase de cultivo no está identificado. Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.2.2 para expandir la línea celular con medio de cultivo RPMI 1640. Al analizar la muestra 24 h después se observó:

- Densidad: Se observó una densidad celular aproximada del 50 % (Figura 14).
- Proliferación: Buen estado proliferativo > 5 % de figuras mitóticas y células brillantes. (Figura 14).
- Muerte celular: Se observó muerte celular escasa sin detritus celular (Figura 14).

Con base en las observaciones, se realizó el procedimiento descrito anteriormente en la sección 2.2.2 para hacer un subcultivo y la formación de esferoides. Finalmente se realizó el conteo celular para depositar  $5 \times 10^4$  células/250  $\mu$ l por duplicado en una microplaca de ultra baja adherencia para la formación de esferoides (Figura 15). En la Figura 16 se puede observar el cultivo después de 48 h de incubación, donde se aprecia un agregado celular. Es necesario realizar la evaluación con diferentes concentraciones celulares para identificar la concentración más adecuada para una formación óptima de esferoides.

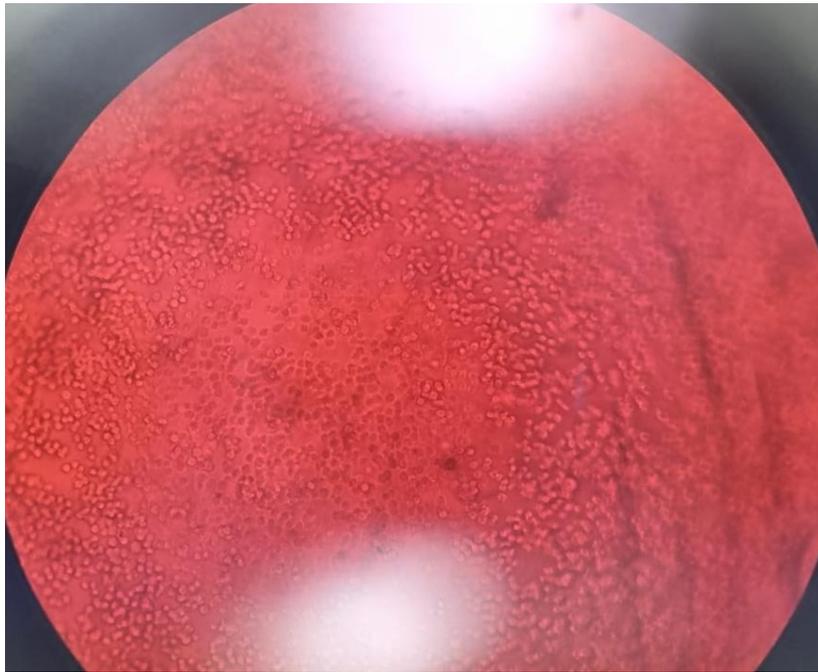


Figura 15. Micrografía del cultivo celular DSG-BC-2 en una microplaca de ultra baja adherencia para la formación de esferoides. Imagen de contraste de fases a 40X.

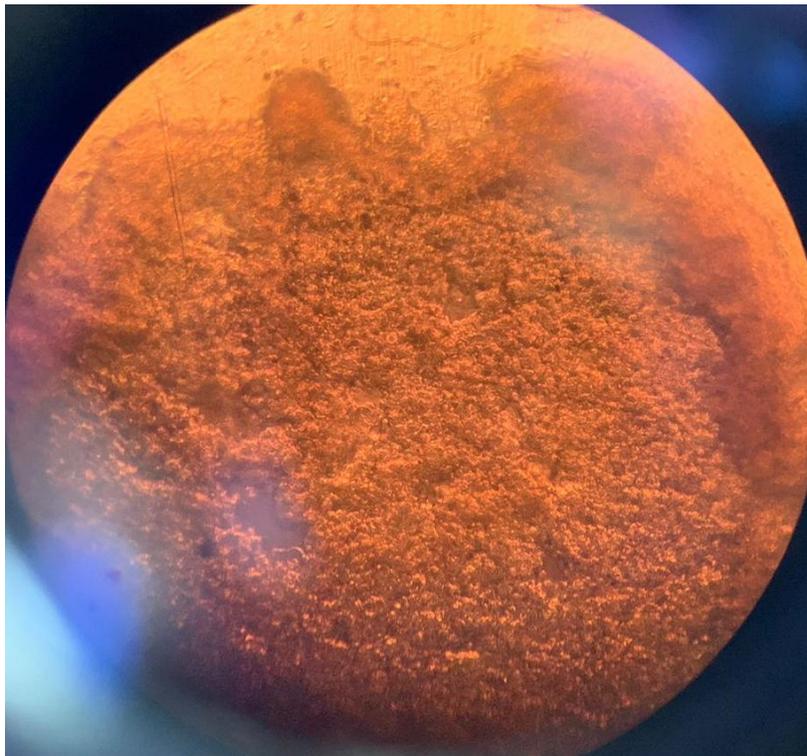


Figura 16. Micrografía de la formación de esferoides (48 h) con  $5 \times 10^4$  células/250  $\mu$ l con el cultivo celular DSG-BC-2 por duplicado. Imagen de contraste de fases a 40X.

## 2.4.6 Valoración visual de la línea celular MDA-MB-31

La línea celular de cáncer de mama primario humano triple negativo deriva de un derrame pleural de una paciente de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastásico. Las células tienen altos índices de proliferación <sup>7</sup>.

El cultivo celular crecía en medio de cultivo CAMA. El número de pase de cultivo no está identificado. Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.2.2 para expandir la línea celular con medio de cultivo RPMI 1640. Al analizar la muestra 24 h después se observó:

- Densidad: Se observó una densidad celular aproximada del 50 % (Figura 17).
- Proliferación: Buen estado proliferativo > 5 % de figuras mitóticas y células brillantes. (Figura 17).
- Muerte celular: Se observó muerte celular escasa sin detritus celular (Figura 17).

Con base en las observaciones, se consideró realizar un subcultivo de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en la sección 2.2.2. Una vez que se obtuvo el pellet se diluyó en 3 ml de medio de cultivo DMEM/F-12 y se sembró en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Finalmente, se colocó en la incubadora a 37 °C.

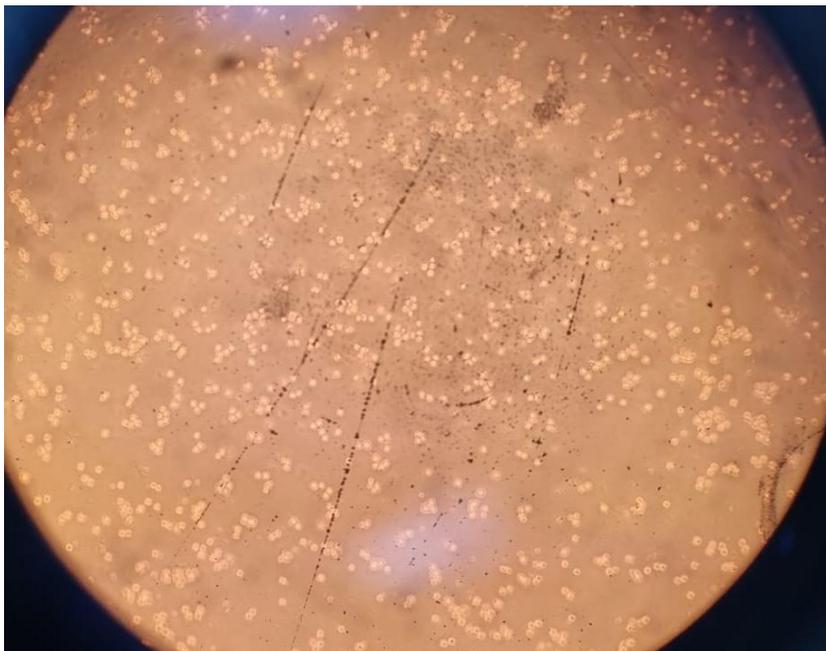


Figura 17. Micrografía del cultivo celular MDA-MB-31. Imagen de contraste de fases a 40X.

## 2.4.7 Valoración visual de la línea celular ECL-1

La línea celular de cáncer de mama primario triple negativo fue establecida por el equipo del Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Deriva de una paciente con obesidad y la expresión de receptores es baja o indetectable en comparación con la línea celular MCF-7. La línea celular se desarrolla adecuadamente en medios de cultivo como DMEM, DMEM/F-12 o RPMI 1640.

El cultivo celular crecía en medio de cultivo CAMA. El número de pase de cultivo no está identificado. Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.2.2 para expandir la línea celular con medio de cultivo RPMI 1640. Al analizar la muestra 24 h después se observó:

- Densidad: Se observó una densidad celular aproximada del 25 % (Figura 18).
- Proliferación: Buen estado proliferativo > 5 % de figuras mitóticas y células brillantes. (Figura 18).
- Muerte celular: Se observó muerte celular escasa sin detritus celular (Figura 18).

Con base en las observaciones, se colocó nuevamente en la incubadora con 37 °C para promover la proliferación celular.

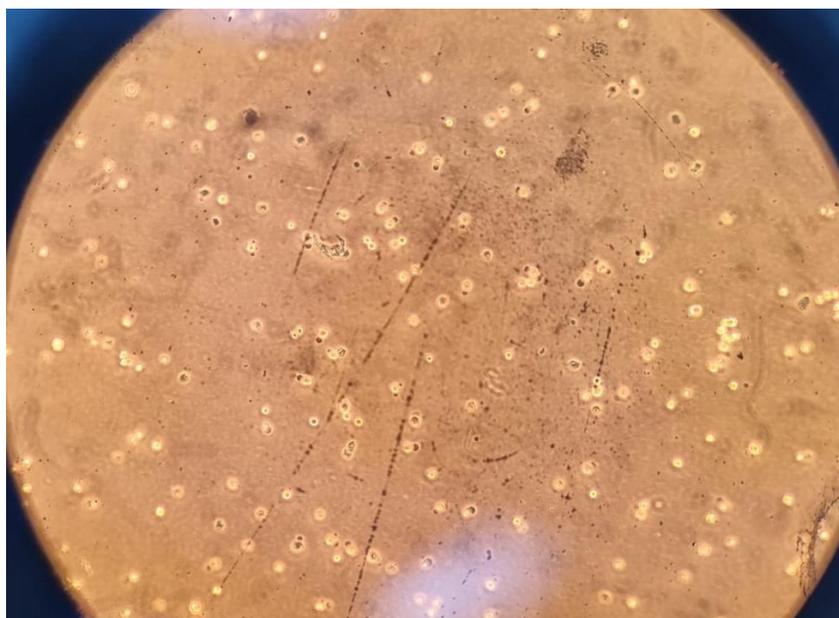


Figura 18. Micrografía del cultivo celular ECL-1. Imagen de contraste de fases a 40X.

## 2.4.8 Valoración visual de la línea celular ECL-2

La línea celular de cáncer de mama primario triple negativo fue establecida por el equipo del Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Deriva de una paciente con obesidad y la expresión de receptores es baja o indetectable en comparación con la línea celular MCF-7. La línea celular se desarrolla adecuadamente en medios de cultivo como DMEM, DMEM/F-12 o RPMI 1640.

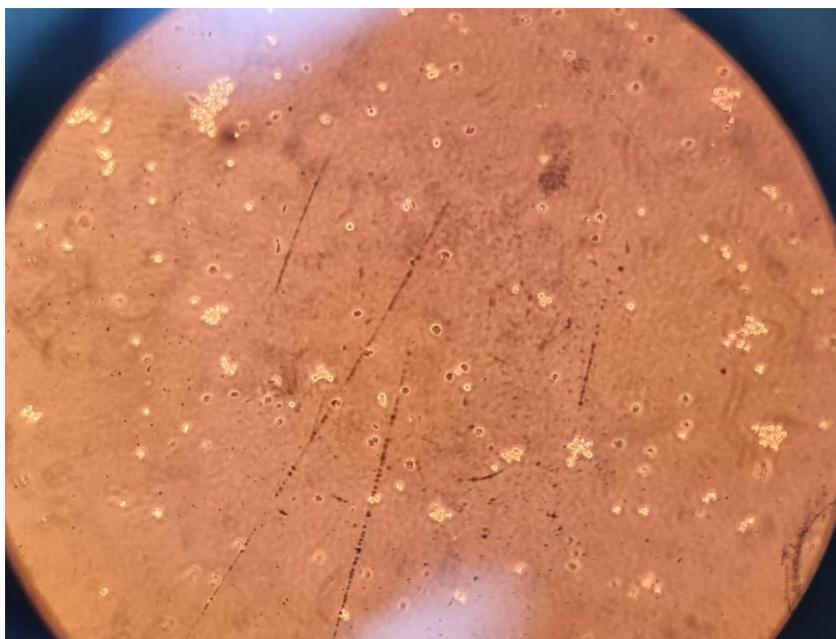


Figura 19. Micrografía del cultivo celular ECL-2. Imagen de contraste de fases a 40X.



Figura 20. Microplaca de ultra baja adherencia para la formación de esferoides.

El cultivo celular crecía en medio de cultivo CAMA. El número de pase de cultivo no está identificado. Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.2.2 para expandir la línea celular con medio de cultivo RPMI 1640. Al analizar la muestra 24 h después se observó:

- Densidad: Se observó una densidad celular aproximada del 10-15 % con un crecimiento con agrupaciones entre 4-10 células (Figura 19).
- Proliferación: Buen estado proliferativo > 5 % de figuras mitóticas y células brillantes. (Figura 19).
- Muerte celular: Se observó muerte celular (20 %) sin detritus celular (Figura 19).

Con base en las observaciones, se consideró cambiar el medio de cultivo e introducir en la incubadora a 37 °C por 48 h. Posteriormente se realizó el procedimiento descrito para la formación de esferoides en la sección 2.2.2. Finalmente, se realiza el conteo para depositar  $5 \times 10^4$  células/250  $\mu$ l y  $1 \times 10^5$  células/250  $\mu$ l por duplicado, en una microplaca de ultra baja adherencia para la formación de esferoides (Figura 20). En la Figura 21 se pueden observar las modificaciones en el cultivo con  $5 \times 10^4$  células/250  $\mu$ l después de 48 h de incubación. Se aprecian agregados celulares más uniformes; sin embargo, aún es necesaria la compactación celular. Por otra parte, en la Figura 22 se observan las modificaciones en el cultivo con  $1 \times 10^5$  células/250  $\mu$ l; los agregados celulares son más irregulares en comparación con el cultivo con una menor concentración celular. Por lo tanto, es necesario realizar más evaluaciones para determinar la concentración celular más adecuada, así como el tiempo de incubación necesario para la formación de esferoides.

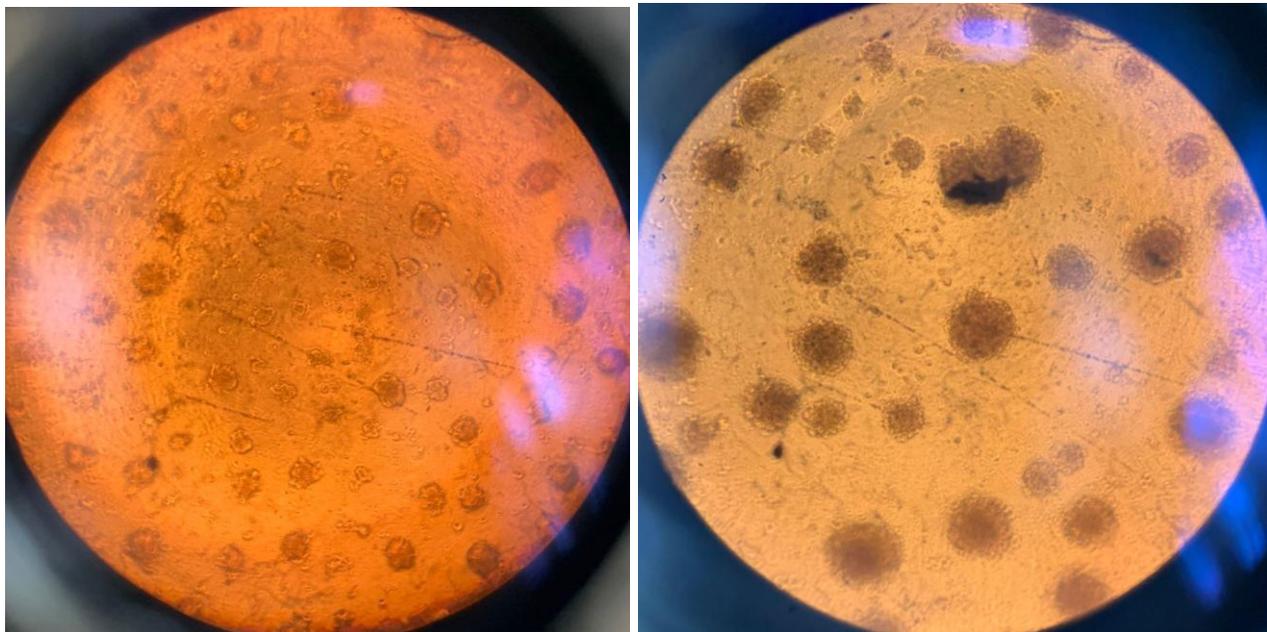


Figura 21. Micrografía de la formación de esferoides (48 h) con  $5 \times 10^4$  células/250  $\mu$ l con el cultivo celular ECL-2 por duplicado. Imagen de contraste de fases a 40X.

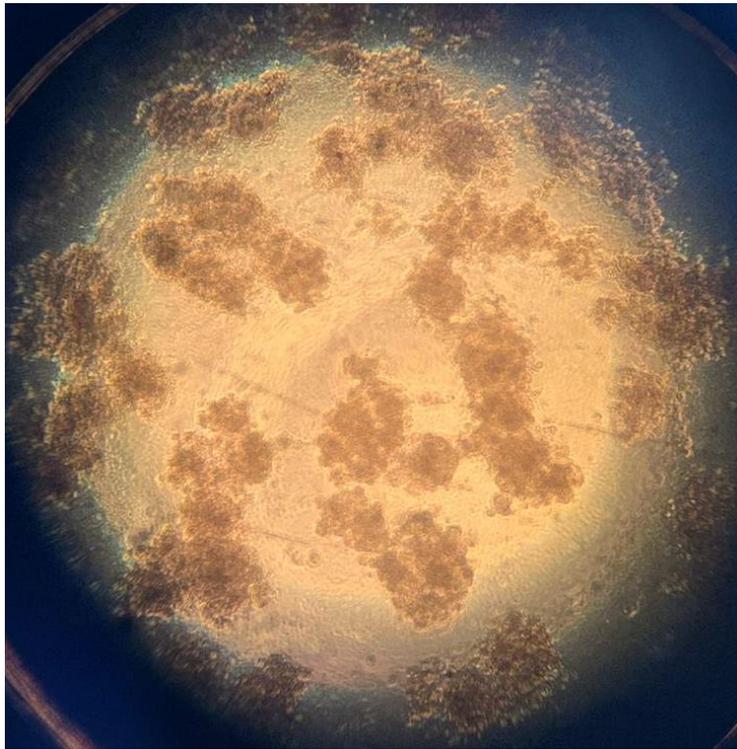


Figura 22. Micrografía de la formación de esferoides (48 h) con  $1 \times 10^5$  células/250  $\mu$ l con el cultivo celular ECL-2. Imagen de contraste de fases a 40X.

## 2.5 Conclusiones

De acuerdo con el objetivo I se evaluaron las condiciones de cultivo de las líneas celulares MCF-7, RAW 264.7 y MDA-MB-31, ECL-1, ECL-2, DSG-BC-1, DSG-BC-2 y EA.hy 926 en cultivos 2D para determinar los parámetros necesarios para su cultivo en una plataforma microfluídica. Se determinó que las ocho líneas celulares se desarrollan adecuadamente en medio de cultivo RPMI 1640 bajo condiciones controladas a 37 °C, presión parcial de CO<sub>2</sub> del 5 % y una atm de 100 % de humedad relativa. Adicionalmente se realizaron evaluaciones para la formación de esferoides con las líneas celulares MCF-7, DSG-BC-2 y ECL-2. Donde la línea celular ECL-2 presentó mejores características para la formación de esferoides.

Por lo tanto, las evaluaciones posteriores se llevarán a cabo con medio de cultivo RPMI 1640 en un dispositivo microfluídico que permita mantener las condiciones de cultivo señaladas. Para realizar las evaluaciones en esta etapa del proyecto, donde se plantea monitorear niveles de glucosa similares a los encontrados en el flujo sanguíneo se manejarán concentraciones de glucosa 5 mM. Sin embargo, para aplicaciones posteriores es importante considerar rangos entre 1 – 25 mM, donde se utilizan concentraciones de glucosa 1 mM para simular las condiciones en tejido periférico, glucosa 11 mM para simular hiperglucemia y glucosa 25 mM para condiciones estándar de algunos cultivos<sup>54</sup>.

Es de interés común contar con tecnología que nos permita evaluar la respuesta celular ante estímulos, diferentes parámetros metabólicos, interacciones celulares, tratamientos y conocer a detalle el desarrollo de las enfermedades. Sin embargo, para lograr tal objetivo, es necesario emular el ambiente fisiológico celular y monitorear los parámetros que puedan afectar la viabilidad, el crecimiento, la diferenciación y función celular. El monitoreo de los niveles de glucosa es importante para evaluar la proliferación<sup>17,55,56</sup> y función mitocondrial<sup>4,57,58</sup>, relacionadas con la actividad metabólica celular.

# CAPÍTULO III

---

## BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO

## Capítulo III – Biosensor electroquímico

Los biosensores de glucosa son utilizados comúnmente para el monitoreo de glucosa en pacientes con diabetes<sup>18</sup>. Actualmente existen diferentes modelos que permiten la detección de glucosa en muestras de orina, sudor, saliva, sangre, etc<sup>17,59</sup>. No obstante, aún se realizan diferentes propuestas para llevar a cabo el monitoreo de la manera menos invasiva y en tiempo real. También es importante el monitoreo de glucosa en otras áreas, por ejemplo, en la industria alimenticia para el control de calidad, en bioprocesos y la industria farmacéutica para mejorar la producción, y en cultivos celulares para evaluar el comportamiento celular. Recientemente esta última está ganando popularidad porque permite estudiar con mayor profundidad enfermedades como diabetes, problemas cardiovasculares, hiperglicemia, problemas vasculares, procesos inflamatorios, citotoxicidad, estimulación de receptores o transportadores, cáncer, inhibidores de glucosa, daño mitocondrial, etc<sup>4,19,20,25,60,61</sup>. Un ejemplo claro es en el caso de células cancerígenas, donde el consumo de glucosa es más elevado por el efecto Warburg, en donde se metaboliza glucosa por glicolisis bajo condiciones anaeróbicas. De esta manera el monitoreo de glucosa en células cancerígenas podría dar información del comportamiento celular ante diferentes estímulos para el desarrollo de tratamientos o bien, para comprender los procesos celulares (proliferación, metabolismo, etc.)<sup>18,24,56</sup>.

Cabe mencionar que cada área tiene diferentes requerimientos y es importante el desarrollo de biosensores con características específicas en estabilidad, rango de detección, especificidad y sensibilidad. En el caso de los cultivos celulares, el medio de cultivo es considerado una matriz compleja por su composición. Actualmente es posible monitorear los niveles de glucosa por cromatografía líquida, espectroscopía Raman, espectrofotometría, cromatografía de gases, análisis de fluorescencia, etc<sup>17,24,60</sup>, pero no es factible integrar la mayoría de estas técnicas en plataformas microfluídicas para el monitoreo *in-line* de glucosa<sup>17</sup>. El muestreo continuo interrumpe el proceso de cultivo, incrementa el riesgo de contaminación y puede diluir metabolitos de interés al añadir medio fresco<sup>62</sup>. Por esta razón, los biosensores electroquímicos surgieron como una alternativa para contrarrestar estos problemas<sup>56</sup>.

Uno de los principales objetivos en el área de la salud es comprender la complejidad de la fisiología humana y las enfermedades. Para esto, se han utilizado modelos animales y cultivos celulares (2D), sin embargo, los resultados no son comparables con la respuesta en el cuerpo humano<sup>1-3,30</sup>. Por esta razón se trabaja en el desarrollo de modelos que puedan emular la fisiología humana, el uso de

dispositivos microfluídicos y la facilidad para integrar cultivos celulares en 3D y técnicas de diagnóstico/monitoreo han dado pie al desarrollo de las plataformas *organ-on-a-chip*. En este sentido, es posible controlar y modificar la composición y condiciones físicas, facilitando el estudio de las respuestas celulares ante estímulos específicos<sup>4-6,63,64</sup>.

La glucosa es la principal fuente de carbono para diferentes tipos celulares y su cuantificación proporciona información sobre el metabolismo, la proliferación y viabilidad celular<sup>17-24</sup>. Sin embargo, es importante considerar que en cada evaluación habrá diferentes factores que contribuirán al consumo de glucosa, como el tipo, tamaño o densidad celular, o bien, la actividad metabólica, parámetros que serán considerados para evaluar cada sistema<sup>56</sup>.

Actualmente la mayoría de los sensores comerciales de glucosa se basan en electroquímica por los bajos costos, respuestas rápidas y la sensibilidad<sup>65</sup>. Sin embargo, aún se evalúan sistemas que puedan monitorear los niveles de glucosa en tiempo real en cultivos celulares 3D y específicamente en modelos *organ-on-chip*. El desarrollo de biosensores estables es un reto por su predisposición a la pasivación debido a la complejidad de los medios de cultivo celulares<sup>58</sup>. Debido a los requerimientos y altos estándares considerados para los biosensores de glucosa, actualmente el nivel de integración en modelos de cultivo 3D varía considerablemente. Es común que la mayoría de los reportes incluyan el análisis de glucosa *off-chip*<sup>4,17,56,66</sup> y la necesidad de realizar un pretratamiento a las muestras<sup>17,66</sup> para poder ser analizadas, factores que impactan en la reproducibilidad del sistema por la manipulación constante. Adicionalmente, es común el uso de carbono<sup>17,56,66</sup> como electrodo de trabajo (WE) y biosensores de primera generación<sup>4,35,66</sup>, sin embargo, se contemplan metodologías complejas en el diseño de los biosensores<sup>17,35,55,67</sup> y el uso de membranas<sup>17,35,66</sup> para evitar la pasivación de los electrodos. En consecuencia, hay pocos reportes que realizan las evaluaciones en contacto directo con las células y realizan las evaluaciones continuamente<sup>35</sup>. Por lo tanto, es necesario diseñar metodologías más amigables, estables y económicas para monitorear en tiempo real diferentes modelos de cultivo celular. En el presente trabajo se evalúan biosensores electroquímicos de primera y segunda generación para monitorear los niveles de glucosa directamente en cultivos celulares, sin necesidad de detener los experimentos o diluir las muestras.

### 3.1 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas estudian la relación entre los efectos eléctricos y químicos, o bien, la evaluación de cantidades eléctricas (corriente, potencial o carga) y su relación con los parámetros

químicos. Se analizan los procesos y factores que afectan el transporte de carga entre la interfase de un conductor electrónico (electrodo) y un conductor iónico (el electrolito) cuando se aplica un potencial (energía necesaria para mover una carga contra un campo eléctrico) y pasa corriente (flujo de carga eléctrica que recorre un material por el movimiento de iones y electrones). La carga es transportada a través del electrodo por el movimiento de electrones y hoyos. La reacción química que ocurre en toda la celda se lleva a cabo por dos reacciones independientes, que describen los cambios químicos en dos electrodos. Cada reacción y su composición responden a la diferencia interfacial de potencial en cada electrodo. Sin embargo, solo nos interesa una de las dos reacciones y esta ocurre en el electrodo de trabajo. Para enfocarnos únicamente en esta reacción, el electrodo de referencia se estandariza (compuesto de fases que tienen una composición constante). Estos electrodos se mantienen estables constantemente y por lo tanto cualquier cambio en la celda es atribuible al electrodo de trabajo <sup>68,69</sup>.

El potencial del electrodo de trabajo se controla con respecto al de referencia, o sea, se controla la energía de los electrones en el electrodo de trabajo. Cuando se lleva el electrodo a potenciales más negativos aumenta la energía de los electrones. Pueden alcanzar un nivel de energía suficiente para transferirse a estados electrónicos vacantes de especies en el electrolito. En este caso, un flujo de electrones desde el electrodo a la solución se lleva a cabo (reducción). De manera similar, la energía de los electrones puede ser disminuida al imponer un potencial positivo y en este punto, los electrones presentes en los solutos del electrolito encontrarán una energía más favorable en el electrodo y se transferirán ahí. Su flujo será desde la solución al electrodo (oxidación). Los potenciales a los cuales ocurre este proceso están relacionados con el potencial estándar de la especie química en el sistema. Esta variación de potencial puede producir un flujo de corriente al circuito externo porque los electrones cruzan la interfase entre el electrodo y el electrolito mientras ocurre la reacción. La cantidad de electrones que cruzan esta interfase está relacionada con la cantidad de reactivo consumido y producto generado. El número de electrones se mide en Coulombs (C) donde 1 C es equivalente a  $6.24 \times 10^{18}$  electrones. La relación entre la carga y la cantidad de producto formado está dada por la ley de Faraday. La corriente  $i$  es la cantidad de flujo de C o electrones, donde la corriente de 1 Ampere es equivalente a 1 C/s. De este modo, al graficar la corriente en función del potencial podemos obtener información de la naturaleza de la solución, de los electrodos y de la reacción que ocurre en la interfase

<sup>68</sup>.

Las técnicas electroquímicas permiten el análisis de los procesos que ocurren en la interfase entre el electrodo y la solución. Uno de los elementos que diferencia los tipos de técnicas electroquímicas es el tipo de señal utilizada para cuantificar. Los dos tipos principales son potenciométricos (potencial

medido) y potenciostáticos (potencial controlado). En ambos casos, se requieren por lo menos de dos electrodos y una solución de contacto (electrolito), lo cual constituye la celda electroquímica<sup>68,69</sup>. El objetivo de los experimentos potenciostáticos es obtener una corriente en respuesta a la concentración del analito de interés, lo cual puede deducirse al evaluar la transferencia de electrones durante el proceso redox del analito:



donde O y R representan las formas oxidadas y reducidas, respectivamente. La reacción ocurrirá en una región de potencial que haga la transferencia de electrones favorable termodinámica y cinéticamente. Para los sistemas controlados por las leyes de la termodinámica, el potencial del electrodo podrá ser utilizado para establecer la concentración de las especies electroactivas en la superficie [ $C_O(0,t)$  y  $C_R(0,t)$ ] según la ecuación de Nernst:

$$E = E^{\circ} + \frac{2.3RT}{nF} \log \frac{C_O(0,t)}{C_R(0,t)}, \quad 1.2$$

donde  $E^{\circ}$  es el potencial estándar para la reacción redox, R es la constante universal de los gases ( $8.314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), T es la temperatura en K, n es el número de electrones transferidos en la reacción y F es la constante de Faraday (96.487 C). En potenciales más negativos que  $E^{\circ}$ , la forma oxidada tiende a ser reducida y en consecuencia, la reacción de reducción siguiente es más favorable. La corriente resultante por el cambio en el estado de oxidación de las especies electroactivas es llamado corriente faradaica porque obedece la ley de Faraday. Por lo tanto, se puede decir que la corriente faradaica es una medida directa del rango de la reacción redox y aporta información sobre el transporte de masa (Figura 23), que puede ocurrir a través de difusión (movimientos espontáneos bajo la influencia del gradiente de concentración), de convección (transporte al electrodo por el gradiente de densidades o por la aplicación de energía mecánica externa, como agitación, flujo, rotación, vibración, etc.) o de migración (el movimiento de partículas cargadas a través del campo eléctrico). Las reacciones simples involucran únicamente el transporte de masa de las especies electroactivas a la superficie del electrodo, la transferencia de electrones a través de la interfase y el transporte del producto al seno de la solución. En cambio, las reacciones más complejas incluyen procesos adicionales (químicos y de superficie)<sup>69</sup>.

El uso de las mediciones electroquímicas para propósitos analíticos tiene un rango muy amplio para su aplicación, incluyendo monitoreos ambientales, controles de calidad, análisis biomédicos y su creciente aplicación en el diseño de biosensores<sup>69</sup>.

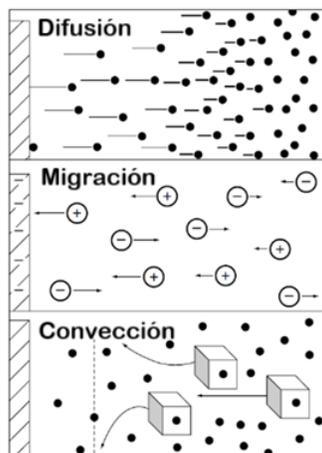


Figura 23. Modos de transporte de masa <sup>69</sup>.

### 3.1.1 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) es una de las técnicas electroquímicas más empleadas por su óptima relación entre sencillez operacional y la cantidad de información que puede aportar. Es una técnica cualitativa, provee información sobre la termodinámica de los procesos redox y de la cinética de reacciones heterogéneas de transferencia de electrones, reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción <sup>69</sup>. En su ejecución, se realiza un barrido lineal de potencial sobre el electrodo de trabajo, variado a velocidad constante entre dos valores límite de forma cíclica. El perfil potencial-tiempo de un ciclo es de tipo triangular (Figura 24), en el que los vértices son los límites superior e inferior de potencial y el valor absoluto de la pendiente de los lados, la velocidad de barrido. Aunque el barrido de potencial puede terminar al final del primer ciclo, pueden realizarse ciclos sucesivos <sup>70</sup>.

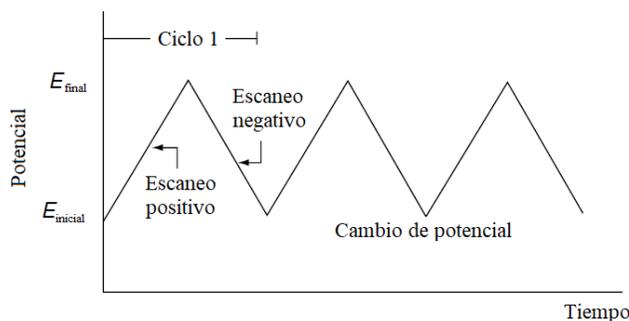


Figura 24. Señal de excitación potencial-tiempo en VC <sup>69</sup>.

Usualmente, la VC es el primer experimento realizado en un estudio electroanalítico, facilita localizar el potencial redox de las especies electroactivas y evalúa el efecto del medio en los procesos redox

<sup>69</sup>. El análisis de la respuesta de la corriente proporciona información de la cinética y del mecanismo del proceso global. En la respuesta típica de un proceso faradaico para una especie, la corriente aumenta a medida que lo hace el sobrepotencial aplicado ( $E - E^{\circ}$ ), hasta que se alcanza el máximo gradiente de concentración para la especie reactiva, que es el que determina la velocidad a la que se difunden las moléculas hacia la superficie <sup>70</sup>. Se asume que únicamente la forma oxidada O está presente inicialmente. Por lo tanto, un potencial positivo se elige para la primera mitad del ciclo, iniciando a partir de un valor donde no hay reducción. Conforme el potencial aplicado se acerca al  $E^{\circ}$  para el proceso redox, la corriente anódica empieza a incrementar hasta alcanzar el pico. En el máximo de corriente, la concentración de la especie reactiva en la superficie desciende a cero, mientras que el gradiente comienza a disminuir por empobrecimiento de la especie en el entorno del electrodo. Por lo tanto, una vez que se pasa la región de potencial donde ocurren los procesos de reducción, la dirección del potencial de barrido cambia. Durante el escaneo negativo, las moléculas O son reducidas y como resultando se observa el pico catódico. El gráfico resultante de corriente y potencial se llama voltamperograma cíclico. La Figura 25 ilustra la respuesta esperada de una pareja redox reversible durante un ciclo de potencial <sup>69</sup>.

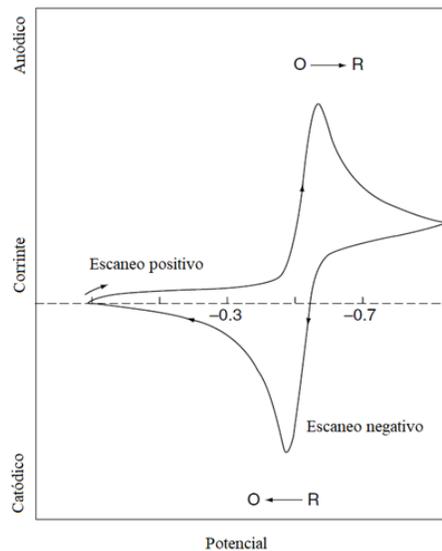


Figura 25. VC de un proceso redox reversible  $O + ne^- \leftrightarrow R$  <sup>69</sup>.

A los procesos faradaicos descritos se suman los procesos de origen capacitivo, que dan lugar a una línea base horizontal de signo positivo en el barrido positivo y negativa en el barrido negativo, como resultado de la migración de iones para compensar la creciente densidad de carga. A esta contribución de fondo se le denomina comúnmente doble capa capacitiva y su amplitud está relacionada con el área activa real del electrodo. La corrección de la doble capa debe tenerse en cuenta a la hora de

estimar la corriente de pico debida a un proceso faradaico <sup>70</sup>.

### 3.1.2 Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica muy útil para determinar los coeficientes de difusión de especies electroactivas, o bien, determinar el área electroactiva del WE. Como bien lo sugiere su nombre, cuando se aplica un potencial que provoca una reacción electroquímica, la corriente cambia con el tiempo. Por lo tanto, se estudian las variaciones de corriente con respecto al tiempo <sup>69,71</sup>. Esta técnica involucra un potencial escalonado en el electrodo de trabajo. El paso inicial es un potencial en el cual no ocurren reacciones faradaicas y posteriormente el cambio a un potencial en donde la concentración superficial de las especies electroactivas es cero efectivamente. Como resultado, se monitorea la dependencia resultante de la corriente a través del tiempo. Es importante mencionar que el transporte de masa bajo estas condiciones se lleva a cabo únicamente por difusión y, por lo tanto, la curva de la corriente con respecto al tiempo refleja los cambios en el gradiente de concentración en la superficie del electrodo. En consecuencia, se considera una expansión gradual de la capa de difusión asociada al agotamiento de la especie electroactiva, y como resultado, una disminución en la curva que representa el perfil de concentración con el paso del tiempo <sup>69</sup>. De esta manera se puede observar que la corriente disminuye con el paso del tiempo, lo cual puede explicarse a través de la ecuación de Cottrell,

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2} \quad 1.3$$

en donde n, F, A, C, D y t, representan el número de electrones, la constante de Faraday, el área superficial, la concentración, el coeficiente de difusión y el tiempo, respectivamente. Las desviaciones de ese comportamiento ocurren por evaluaciones realizadas en periodos largos (mayores a 100 s) como resultado de los efectos de convección por reacciones químicas acopladas, el uso de electrodos que no son planos o microelectrodos con grandes perímetros <sup>69</sup>.

### 3.2 Biosensores

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés), un biosensor es definido como un dispositivo autónomo e integrado, capaz de dar información analítica cualitativa, cuantitativa o semi-cuantitativa en respuesta de la interacción de elementos biológicos de reconocimiento (receptor bioquímico, anticuerpos, oligonucleótidos, etc) con el analito de interés <sup>72</sup>.

Son dispositivos analíticos que convierten una respuesta biológica en una señal (eléctrica, colorimétrica, etc.). Están integrados por tres componentes principales (Figura 26), un biorreceptor o elemento de reconocimiento, un transductor y un procesador de señal o amplificador. El biorreceptor reconoce el analito de interés y el transductor convierte la respuesta biológica correspondiente en una señal eléctrica medible y equivalente a la señal biológica. El amplificador es responsable de transformar una señal de entrada en una señal de salida apreciable, que contenga las características de la interacción <sup>73</sup>. Es de suma importancia considerar el control de todos los elementos y factores para obtener resultados certeros.

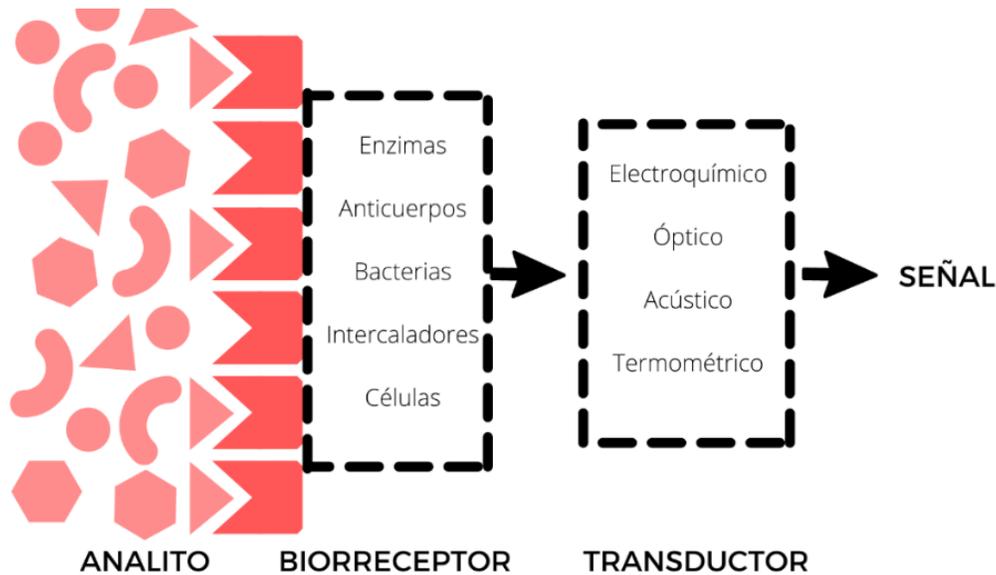


Figura 26. Tipos de componentes en biosensores.

El desarrollo de biosensores involucra diferentes campos de investigación que convergen en tres líneas fundamentales: elementos de reconocimiento molecular, herramientas y técnicas para su construcción y diseño de sensores básicos. El proceso de reconocimiento molecular se rige por la forma y el tamaño del receptor y por el ligando de interés (analito), se caracteriza por una elevada afinidad y especificidad en las reacciones bioquímicas <sup>69</sup>. Dichas características los convierten en opciones altamente atractivas como herramientas analíticas por su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y bajo coste, entre otras <sup>74</sup>.

### 3.2.1 Biorreceptores

Los biorreceptores son especies moleculares que utilizan un mecanismo bioquímico para el reconocimiento del analito. Es el elemento que aporta especificidad al biosensor, tiene la capacidad de unirse de forma específica al analito de interés para su identificación. Se clasifican seis categorías principales: anticuerpo/antígeno, enzimas, ácidos nucleicos/DNA, sistemas celulares, biomiméticos y bacteriófagos <sup>75</sup>.

### 3.2.2 Transductores

Los transductores son dispositivos accionados por la energía de un sistema (interacción analito-bioreceptor), transforman en magnitudes eléctricas cuantificables las variaciones de las propiedades fisicoquímicas inducidas en consecuencia de la interacción <sup>74,76</sup>. La naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito constituye el factor determinante para la selección del sistema de transducción, sin el cual no es posible obtener, amplificar, registrar, sistematizar, almacenar e interpretar las señales producidas de la interacción entre estos <sup>77</sup>. Los transductores juegan un papel importante en el proceso de detección de los biosensores y se pueden clasificar según el método que utilicen: ópticos, electroquímicos, termométricos, magnéticos, piezoeléctricos, nanomecánicos, etc. <sup>75</sup>.

#### 3.2.2.1 Transductores electroquímicos

Los transductores electroquímicos se basan en las características electroquímicas generadas por la interacción entre el analito y el sistema de reconocimiento, proporcionando información analítica cuantitativa o semicuantitativa. Convierten reacciones químicas producidas por la oxidación y reducción en señales eléctricas; los productos o reacciones pueden ser correlacionados con la concentración de especies electroactivas. Para el adecuado funcionamiento del biosensor, el elemento de reconocimiento y el sistema de transducción deben estar en contacto directo. La eficiencia de conversión depende de la cinética de la reacción redox de las especies electroactivas, del material del transductor, de los tipos de analitos y de los factores ambientales. Tienen la ventaja de tener una estructura simple, alta sensibilidad, una construcción de bajo costo y potencial para su miniaturización. En esta modalidad de transducción, existen cuatro tipos de biosensores: potenciométricos, amperométricos, conductimétricos e impedimétricos y cargados de iones o con efecto de campo, de los cuales se enlistan algunos ejemplos en la Tabla 1 <sup>74,78</sup>.

Tabla 1. Tipos de transductores electroquímicos para distintos tipos de mediciones <sup>79</sup>.

Tipo de medición	Transductor	Analito
<b>Potenciométricos</b>	Electrodos con iones selectivos	K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup> , F <sup>-</sup>
	Electrodos de vidrio	H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup>
	Electrodos de gas	CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>
	Electrodos de metal	Especies redox
<b>Amperométricos</b>	Electrodos de metal o carbono	O <sub>2</sub> , azúcares, alcoholes
	Electrodos modificados químicamente	Azúcares, alcoholes, fenoles, oligonucleótidos
<b>Conductimétricos</b>	Electrodos interdigitados	Urea, especies cargadas,
<b>Impedimétricos</b>	Electrodos de metal	oligonucleótidos
<b>Cargados de iones o con efecto de campo</b>	Transistores con efecto de campo, sensibles a iones/enzimas	H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>

### 3.2.2.2 Transductores amperométricos

Se basan en la medida de la corriente resultante de la oxidación o reducción electroquímica de especies electroactivas que se producen entre el sistema de bioreconocimiento y un electrodo. Usualmente se mantiene un potencial constante en un electrodo de trabajo (Pt, Au, C) o en un arreglo de electrodos donde el electrodo de referencia sirva también como electrodo auxiliar (con corrientes bajas 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-6</sup> A). La corriente resultante es correlacionada directamente con la concentración de las especies electroactivas o con su rango de producción o consumo en la capa biocatalítica. La posibilidad de poder incorporar en el electrodo otros componentes, como mediadores redox, cofactores u otras biomoléculas, confiere a este tipo de biosensores una gran versatilidad de usos <sup>74,79</sup>.

### 3.3 Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos combinan las características analíticas de las técnicas electroquímicas con procesos específicos de reconocimiento biológico. El objetivo es relacionar señales eléctricas con la interacción de procesos biológicos y compuestos electroactivos para identificar directamente un analito en una muestra. Idealmente, el sistema debería ser capaz de responder con continuidad y reversiblemente sin perturbar la muestra <sup>69</sup>.

El desarrollo de este tipo de sensores es una de las áreas más activas de la investigación analítica. Actualmente están disponibles para su uso comercial y se emplean en diversas áreas (salud, industria, ambiente, agricultura, etc.). Se caracterizan por ser simples, compactos, rápidos, de bajo costo, portables, no son afectados por adsorción visible o turbidez de las muestras, usualmente generan una señal clara y fácil de interpretar, es posible hacer sistemas desechables sin los problemas de limpieza,

regeneración o contaminación cruzada y adicionalmente, son fáciles de miniaturizar y compatibles con la microfluídica y nanotecnología. Se pueden distinguir dos áreas en el manejo de sensores electroquímicos, las cuales se clasifican según el tipo de proceso empleado para el reconocimiento biológico <sup>69,80</sup>:

- Dispositivos biocatalíticos: utilizan enzimas, células o tejidos como componentes inmovilizados para la detección del analito.
- Biosensores de afinidad: utilizan anticuerpos, receptores de membrana, ácidos nucleicos, entre otros, para la identificación del analito.

### 3.3.1 Biosensores electroquímicos enzimáticos

Los electrodos enzimáticos se basan en el acoplamiento de una enzima con un electrodo apropiado. La capa enzimática inmovilizada es elegida para catalizar una reacción, la cual genera o consume especies detectables:



en donde S y C representan al sustrato y cofactor, respectivamente, y P y C' son los productos correspondientes. La elección de los componentes depende principalmente del sistema enzimático utilizado. Como resultado del acoplamiento, los electrodos enzimáticos han demostrado ser extremadamente útiles para el monitoreo de una gran variedad de analitos de gran importancia clínica, ambiental y del sector alimenticio <sup>69</sup>.

Los biosensores enzimáticos son extremadamente específicos a un analito y su flexibilidad permite llevar a cabo la identificación de una gran variedad de analitos en cultivos celulares. Sin embargo, es importante considerar que el desempeño de los biosensores enzimáticos está influenciado por el pH, temperatura y por la cantidad y tipo de enzimas <sup>81</sup>. La importancia de las enzimas en la fabricación de sensores es la selectividad, por su especificidad con moléculas particulares. Generalmente son clasificadas en seis categorías según el método de reconocimiento: oxidorreductasas (reacciones redox), transferasas (transferencia de grupos moleculares), hidrolasas (hidrólisis de moléculas), liasas (adición de un grupo funcional), ligasas (unen dos moléculas) e isomerasas (generan formas isoméricas por la adición de grupos funcionales). Sin embargo, nos centraremos en las oxidorreductasas, como es el caso de glucosa oxidasa o lactato oxidasa <sup>27,81,82</sup>. Las oxidorreductasas

son una clase de enzimas que catalizan las reacciones redox al simplificar la transferencia de electrones de los agentes reductores (donadores de electrones) a los agentes oxidantes (aceptores de electrones) <sup>81</sup>.

Cabe mencionar que las dos familias de enzimas más utilizadas para la oxidación de glucosa son las glucosas oxidasas (GOx) y las glucosas deshidrogenasas (GDH). Sin embargo, estas enzimas difieren en varios aspectos; como en los potenciales redox, en los cofactores, en la estabilidad de los enlaces que establecen con las apoenzimas y sus cofactores, en las constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), en la selectividad que tienen con glucosa, etc. En el caso de GOx, su cofactor FAD es muy estable por los fuertes enlaces que establece con apo-GOx. Una vez que la glucosa ha sido oxidada por FAD,  $FADH_2$ -GOx reacciona con  $O_2$  y genera  $FAD$ -GOx +  $H_2O_2$  para realizar nuevamente la reacción, por lo tanto, se evalúa la disminución en la concentración de  $O_2$  para validar la oxidación de glucosa. Esta enzima tiene una especificidad relativa por glucosa, en la reacción electroquímica en la que la glucosa es oxidada por  $FAD$ -GOx, alrededor de  $5 \times 10^3$  moléculas de glucosa son oxidadas por segundo. Se ha determinado que el potencial formal redox de esta enzima en un medio con pH de 7.2 es de -0.048 V vs. el electrodo estándar de hidrógeno (*SHE*, por sus siglas en inglés). Por otra parte, la enzima GDH tiene el cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ), el cual cataliza la oxidación de glucosa y otros azúcares. El cofactor crea enlaces más estables con apo-GDH en un medio con exceso de  $Ca^{2+}$ . En la reacción electroquímica en la que la glucosa es oxidada por PQQ-GDH, alrededor de 11,800 moléculas de glucosa son oxidadas por segundo. Su potencial redox en un medio con exceso de  $Ca^{2+}$  y pH 7 es de  $10.5 \pm 4$  mV vs. *SHE*. Por otra parte, es importante mencionar que en medios complejos la selectividad del sistema es crucial, a pesar de que GDH es más sensible, oxida otros azúcares y por lo tanto, GOx es la enzima más utilizada en la detección de glucosa <sup>83</sup>.

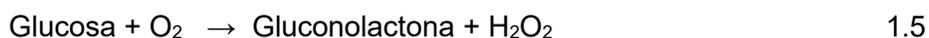
Como se mencionaba, anteriormente la detección de glucosa con la enzima GOx se determinaba a través de la disminución en la concentración de  $O_2$ . Esto es debido a que el paso directo de electrones de  $FADH_2$  a un electrodo es muy lento en comparación con el rango de oxidación de glucosa por FAD. La distancia de  $FADH_2$  que se encuentra a 13-15 Å dentro de la enzima y en consecuencia más alejado de la superficie del electrodo dificulta el flujo de electrones. Por lo tanto, resulta muy complicado medir la oxidación directa de glucosa sin el uso de un mediador <sup>83</sup>. En este sentido, el par  $O_2/H_2O_2$  puede ser considerado como el mediador natural de GOx. Sin embargo, su funcionamiento no es óptimo en electroquímica por la baja solubilidad del  $O_2$  en solución. Por lo tanto, se ha estudiado el uso de complejos de ferroceno, hierro, osmio, cobalto y rutenio para facilitar la detección de glucosa. De estos, los derivados de ferroceno han sido los más utilizados y ampliamente estudiados. El ferroceno es lo

suficientemente pequeño para penetrar el canal de reacción de GOx, promueve una rápida transferencia de electrones y su funcionamiento no es dependiente del pH, pero no es estable en todas sus formas <sup>83</sup>. Sin embargo, en reportes más recientes, se ha registrado que los complejos de osmio son estables en sus formas reducidas/oxidadas ( $Os^{II}/Os^{III}$ ), permiten un transporte rápido de masa y carga, utilizan menores potenciales y por lo tanto, son menos susceptibles a interferentes, y son adecuados para muestras biológicas <sup>84-86</sup>.

### 3.3.1.2 Generaciones de electrodos enzimáticos

Los biosensores enzimáticos son divididos en tres generaciones, según el método utilizado para la transferencia de electrones en las mediciones de las reacciones bioquímicas o la configuración de los elementos que lo conforman (transductor, enzimas, mediadores, cofactores, etc.).

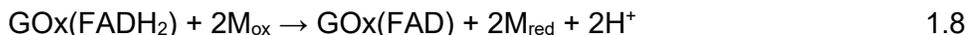
Primera generación: se basan en la detección amperométrica de los analitos/productos de la reacción enzimática que se difunden a la superficie del electrodo y generan una respuesta eléctrica para el monitoreo de la oxidación de glucosa. En este tipo de biosensores, la enzima es inmovilizada en la superficie del electrodo para evaluar su capacidad de transformar un sustrato en un producto electroactivo medible (Figura 27a).



Como se mencionaba, en este tipo de biosensores es posible monitorear la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (+0.7 V vs. Ag|AgCl) o bien, el consumo de  $\text{O}_2$  (-0.7 V vs. Ag|AgCl). Sin embargo, presentan un mayor margen de error en medios con una baja concentración de oxígeno, lo que se traduce en una baja linealidad y estabilidad <sup>87,88</sup>.

Segunda generación: en este tipo de biosensores se utilizan mediadores como agentes oxidantes, capaces de permitir el flujo de electrones entre el centro redox de la enzima y la superficie del electrodo. Esta característica permite trabajar con menores potenciales en comparación con la primera generación, evitando la dependencia con la concentración de  $\text{O}_2$  o interferencias de otras especies electroactivas. Los mediadores más comunes son ferricianuro y ferroceno; sin embargo, hay modelos que utilizan osmio, azul de metileno, fenacinas, violeta de metilo, tionina, etc <sup>87,88</sup>. Un buen mediador se caracterizará por su capacidad de reaccionar con la enzima para minimizar la competencia con  $\text{O}_2$ ,

sus propiedades electroquímicas, baja solubilidad, toxicidad nula y su estabilidad química<sup>89</sup>.



En este caso se puede observar en la reacción que el mediador reducido ( $\text{M}_{\text{red}}$ ) es oxidado ( $\text{M}_{\text{ox}}$ ) en la superficie del electrodo, lo cual genera una señal proporcional a la concentración del analito (Figura 27b). Es importante considerar que los mediadores pueden estar en el medio o ser inmovilizados en la superficie de los electrodos. Si son inmovilizados, es de suma importancia que se encuentren muy cerca de las enzimas, de otra manera se perderá la estabilidad del sistema<sup>87,88</sup>.

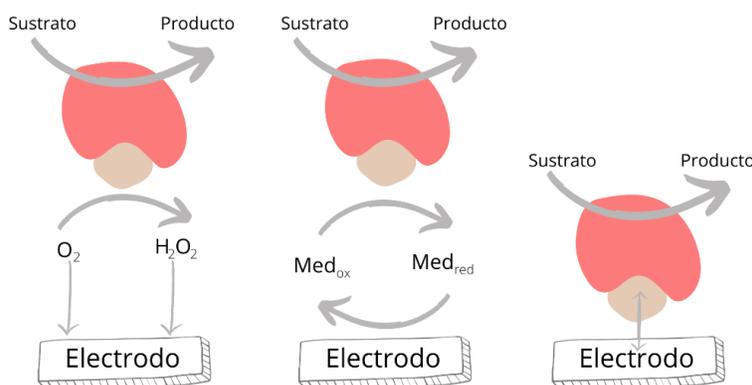


Figura 27. Generaciones de electrodos enzimáticos amperométricos. a) Con el uso de los sustratos secundarios naturales. b) Con el uso de mediadores redox. c) A través de la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo.

Tercera generación: en este modelo se considera la transferencia directa de electrones entre el centro redox de la enzima y el electrodo (Figura 27c). Por lo tanto, se centran en disminuir la distancia entre el centro redox (cofactor) y la superficie del electrodo. Usualmente consisten en 3 elementos: las enzimas como elementos de bioconocimiento, el elemento de unión entre la enzima y la superficie del electrodo y el electrodo. En este modelo el punto crucial es elemento de unión, del cual dependerá la estabilidad del sistema<sup>87,88</sup>.

### 3.3.2 Inmovilización enzimática

Como se mencionaba anteriormente, en esta clase de sensores electroquímicos usualmente el

electrodo de trabajo es funcionalizado con enzimas. Actualmente se han desarrollado múltiples estrategias para inmovilizar las enzimas en los electrodos porque la inestabilidad de las enzimas limita el uso de este tipo de biosensores en sistemas *in vitro*. Por lo tanto, es necesario inmovilizarlas en el electrodo de manera eficiente para asegurar la transferencia de electrones entre el mediador y la superficie del electrodo. Una inmovilización eficiente generará un sensor robusto con una sensibilidad elevada, buena estabilidad en los sistemas y funcional para evaluaciones por largos periodos. Sin embargo, aún no se ha conseguido mantener la estabilidad enzimática por periodos prolongados<sup>27,81,82</sup>. En este punto recae la importancia de desarrollar un sistema estable para su implementación en sistemas *in vitro*.

### 3.4 Diseño y fabricación de electrodos

En esta sección se especifica el proceso de fabricación y modificación de los electrodos que serán integrados en el chip microfluídico para detección de glucosa en medios de cultivo celular.

#### 3.4.1 Diseño y fabricación del chip electroquímico en gota

Se diseñó un chip de tres electrodos (formato CIF). En la Figura 28 se observa el diseño correspondiente.

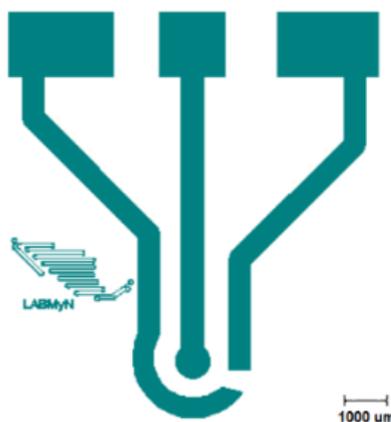


Figura 28. Diseño de chip en gota de tres electrodos.

El proceso posterior se realiza en el cuarto amarillo de la sala blanca de las instalaciones de LABMyN (CIDETEQ) bajo condiciones controladas para evitar la contaminación o el daño de los materiales utilizados. Se seleccionan y limpian sustratos de vidrio para realizar el depósito del diseño. Se utiliza solución piraña ( $H_2SO_4$  y  $H_2O_2$  relación 3:1 v/v) para la limpieza; los sustratos son sumergidos durante

30 min a 150 °C. Una vez finalizado este tiempo, se enjuagan con agua ultrapura para remover los residuos de la solución, se secan con una pistola de aire y se colocan en una parrilla de calentamiento (EMS 1000-1) a 100 °C durante 60 min para eliminar restos de agua. El sustrato se coloca en el equipo *spin coater* (SCS G808P) para obtener una capa uniforme de la resina, sobre el cual se depositan 1.5 ml de fotoresina negativa AZ-nLOF 2020. El equipo es programado a 2,500 rpm durante 30 s para obtener un espesor de la resina de 2 µm aproximadamente. Una vez transcurrido el tiempo, el sustrato se coloca en la parrilla durante 90 s a 110 °C, se retira y se deja enfriar.

Para llevar a cabo la transferencia de los patrones geométricos se utiliza fotolitografía. El sustrato se coloca en el generador de micropatrones (Heidelberg µPG 101) y se programan las condiciones de acuerdo con la resina seleccionada. La potencia del láser (UV) utilizada fue de 14 mW, el tiempo de exposición sobre cada píxel fue del 70 % y finalmente, para las veces que pasa el láser sobre el sustrato y el factor de reducción de tiempo se selecciona 1x1. Una vez terminado el proceso, se retira el sustrato del equipo y se coloca nuevamente en la parrilla durante 90 s a 110 °C; finalizado el tiempo se deja enfriar. Para visualizar el patrón es necesario el uso del revelador AZ 300MIF, indicado para la resina utilizada; se sumerge por 20 s y se coloca inmediatamente en agua ultrapura para detener la reacción. Es necesario enjuagar con agua ultrapura y secar adecuadamente. Finalmente, se evalúa con el microscopio metalográfico (AmScope FMA050) la correcta transferencia de patrones en toda el área de la muestra.

### 3.4.2 Depósito por evaporación de haz de electrones

Para realizar el depósito de oro se utiliza la técnica de evaporación por haz de electrones (equipo Intercovamex D18 – sistema de depósito al alto vacío). Los sustratos con el patrón de interés se colocan en el equipo para realizar el depósito. Como primer paso se deposita una capa de 20 nm de titanio para facilitar la adhesión al sustrato de vidrio, posteriormente se depositan 300 nm de oro. Una vez terminado el proceso, se retiran los sustratos del equipo y se sumergen en el removedor AZ 400T durante 12 h para eliminar la fotoresina (Figura 29). Finalmente se obtiene el patrón del diseño inicial con el depósito de oro, adecuado para el funcionamiento de los electrodos (Figura 30). Los sustratos son evaluados en el microscopio metalográfico (AmScope FMA050) para verificar si el depósito se realizó uniformemente y después son cortados individualmente.

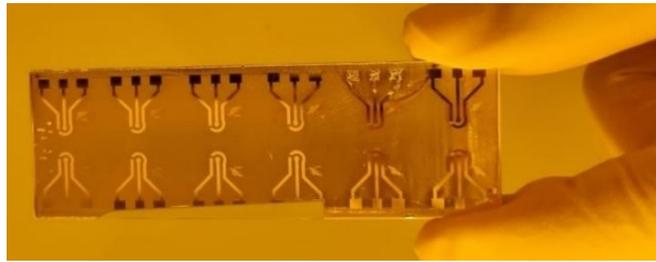


Figura 29. Sustrato de vidrio con el depósito de Ti (20 nm) y Au (300 nm) por evaporación de haz de electrones.

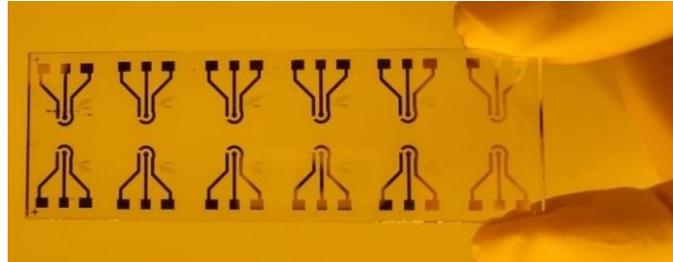


Figura 30. Revelado del depósito de Ti (20 nm) y Au (300 nm) con el removedor AZ 400T (12 h).

### 3.4.3 Electrodo de oro policristalino

Las evaluaciones con electrodos de oro policristalino fueron realizadas con el diseño del chip en gota de tres electrodos, donde se utilizó oro como WE (con área geométrica de  $0.005 \text{ cm}^2$ , ver Figura 31) y CE. Adicionalmente se utilizó un alambre de Ag|AgCl como pseudoreferencia. La celda electroquímica se montó en un soporte de acrílico con pines de oro para establecer la conexión con el potenciostato (BIO-LOGIC modular 2 canales, VSP/Z-01) como se observa en la Figura 32.

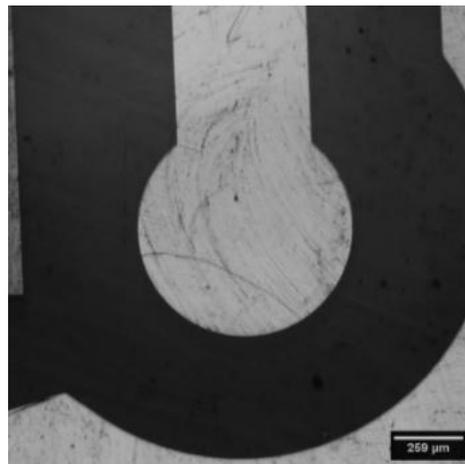


Figura 31. Microscopía óptica (4X) del depósito del electrodo de trabajo de oro policristalino.

### 3.4.3.1 Limpieza de electrodos de oro policristalino

En cada prueba, como primer paso se realizó la limpieza del electrodo de trabajo para eliminar posibles contaminantes orgánicos de procesos anteriores. Se realizó de la manera siguiente:

- Enjuagar con agua ultrapura para eliminar partículas o compuestos adsorbidos débilmente sobre la superficie del electrodo de trabajo.
- Sumergir en una solución de RCA (5:1:1, agua ultrapura,  $H_2O_2$  y  $NH_4OH$ ) por 15 min y enjuagar con agua ultrapura una vez finalizado el tiempo.
- Secar uniformemente la superficie con  $N_2$  y resguardar.

Una vez que los chips son adecuados para realizar evaluaciones se hacen las modificaciones necesarias para llevar a cabo los procedimientos. Los experimentos descritos a continuación se realizaron en un potencióstato/galvanostato BIO-LOGIC modular de 2 canales (VSP/Z-01) y los datos fueron analizados con el software EClab (BioLogic Science Instruments).

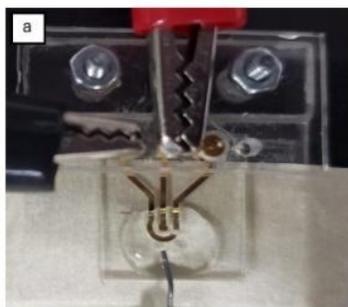


Figura 32. Celda electroquímica con el diseño del chip en gota de 3 electrodos. Utilizando Au para WE y CE, y un alambre de Ag|AgCl como electrodo de pseudoreferencia.

### 3.4.4 Electrodo serigrafiados de carbono

En las evaluaciones con electrodos serigrafiados de carbono (SPE) se utilizó el diseño realizado por el Dr. Fernando Battaglini y la Dra. Lucy Coria del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía de la Universidad de Buenos Aires (INQUIMAE-UBA). Los electrodos de WE (con área geométrica de  $0.086 \pm 0.006 \text{ cm}^2$ , ver Figura 34) y CE son de carbono; sin embargo, previamente se depositó plata para mejorar la conductividad eléctrica (sin exponer el área de reacción). Por su parte el RE es una mezcla de carbono y plata a la cual se le añadió AgCl<sup>59</sup>. Adicionalmente, se adaptó la conexión con un soporte de acrílico elaborado por el Mtro. en Electroquímica Roberto Enríquez

Reyna, como se observa en la Figura 33.

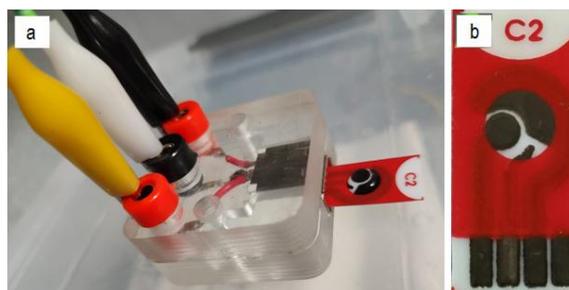


Figura 33. a) Celda electroquímica con electrodos serigrafados de carbono. b) Chip serigrafado con WE, CE y RE de carbono.

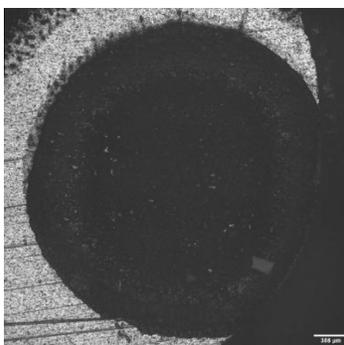


Figura 34. Microscopía óptica (4X) del depósito del electrodo de trabajo de carbón.

### 3.4.4.1 Limpieza de electrodos serigrafados de carbono

En cada prueba, como primer paso se realizó la limpieza del electrodo de trabajo para eliminar posibles contaminantes orgánicos de procesos anteriores. Se realizó de la manera siguiente:

- Enjuagar con agua ultrapura para eliminar partículas o compuestos adsorbidos débilmente sobre la superficie del electrodo de trabajo.
- Limpiar electroquímicamente para eliminar compuestos adsorbidos. Para este procedimiento se utiliza VC, se realizan 40 ciclos o los ciclos necesarios hasta observar una señal estable en *buffer* de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Finalmente es necesario enjuagar nuevamente con agua ultrapura.
- Secar uniformemente la superficie con N<sub>2</sub> y resguardar.

Una vez que los chips son adecuados para realizar evaluaciones se hacen las modificaciones necesarias para llevar a cabo los procedimientos. Los experimentos descritos a continuación se realizaron en un potenciostato/galvanostato de Metrohm (Autolab PGSTAT204) y los datos son

analizados con el software NOVA 2.1.

### 3.4.5 Puntillas de carbono como electrodos de trabajo

Se evaluaron diferentes puntillas de carbono para seleccionar la más adecuada como WE. Las puntillas seleccionadas tienen un diámetro de 500  $\mu\text{m}$  (Figura 35). En este sentido, se utilizará una puntilla de carbono como WE y CE, y un alambre de Ag|AgCl como pseudoreferencia.

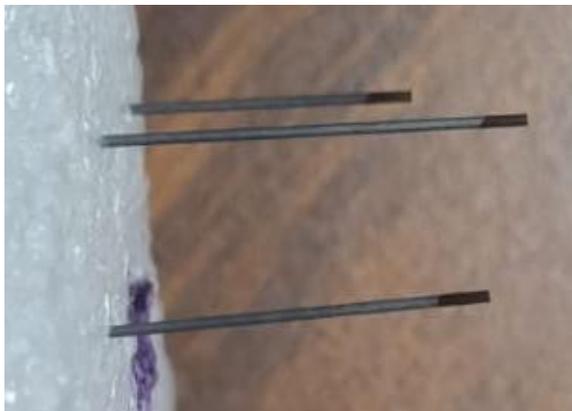


Figura 35. Puntillas de carbono como electrodos de trabajo.

#### 3.4.5.1 Limpieza de puntillas de carbono como WE

En cada prueba, como primer paso se realizó la limpieza del electrodo de trabajo para eliminar posibles contaminantes orgánicos de procesos anteriores. Se realizó de la manera siguiente:

- Enjuagar con agua ultrapura para eliminar partículas o compuestos adsorbidos débilmente sobre la superficie del electrodo de trabajo.
- Limpiar electroquímicamente para eliminar compuestos adsorbidos. Para este procedimiento se utiliza VC. Se realizan 50 ciclos con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M. Posteriormente 50 ciclos o los ciclos necesarios hasta observar una señal estable en *buffer* de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Finalmente es necesario enjuagar nuevamente con agua ultrapura.
- Secar uniformemente la superficie con  $\text{N}_2$  y resguardar.

Una vez que los electrodos son adecuados para realizar evaluaciones se hacen las modificaciones necesarias para llevar a cabo los procedimientos. Los experimentos descritos a continuación se realizaron en un potenciostato/galvanostato de Metrohm (Autolab PGSTAT204) y los datos son analizados con el software NOVA 2.1.

### 3.5 Evaluación y desarrollo de biosensores electroquímicos

Para evaluar la concentración de glucosa en los cultivos celulares se ha propuesto el diseño de biosensores de primera y segunda generación. En esta clase de sensores, usualmente el electrodo de trabajo es funcionalizado con enzimas y con el mediador de interés en los de segunda generación, que al interactuar con el analito, generan un producto que puede ser detectado electroquímicamente<sup>87,88</sup>. Sin embargo, es necesario inmovilizar las enzimas de manera eficiente para asegurar la transferencia de electrones entre el mediador y la superficie del electrodo. Cabe mencionar que el método de inmovilización afectará directamente los parámetros finales, tales como, rango lineal, estabilidad, tiempo de respuesta y selectividad<sup>90</sup>. En nuestro caso nos enfocaremos en el entrecruzamiento, considerando que los agentes entrecruzadores reaccionan formando enlaces covalentes con los elementos de la superficie de la enzima sin comprometer su estructura. Los entrecruzadores más comunes suelen tener grupos epóxido o aldehído, como es el caso del (Figura 36) etilenglicol diglicidil éter (EGDGE) y glutaraldehído (GA)<sup>91</sup>, compuestos que serán evaluados en los siguientes procedimientos.

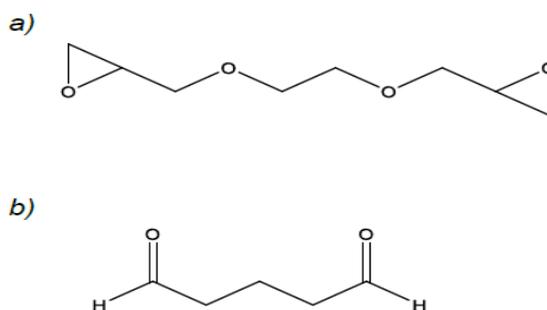


Figura 36. Estructura química del a) EGDGE y de b) GA<sup>92</sup>.

El EGDGE es ampliamente utilizado por los grupos epóxidos que tiene en ambos extremos de su estructura y que tienen la capacidad de reaccionar con grupos amino, carboxilo e hidroxilo. El entrecruzamiento enzimático se lleva a cabo por el ataque diepóxido del EGDGE a los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas en los aminoácidos que conforman la estructura terciaria de la GOx o bien, con los grupos amino del polímero. Al reaccionar con aminas primarias o secundarias, forman aminas secundarias o terciarias, respectivamente y alcoholes secundarios (Figura 37). En el caso de GA, el grupo aldehído reacciona con las aminas primarias formando un enlace covalente doble y como resultado, iminas o enaminas, en el caso de aminas secundarias (Figura 38). Se ha identificado que al igual que EGDGE,

reacciona con los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas presentes en los aminoácidos que conforman la estructura terciaria de la GOx (adicionalmente, es posible que reaccione con grupos tiol, fenol e imidazol) y con los grupos amino del polímero<sup>91</sup>. De esta manera, se forman redes con mayor complejidad y menor distancia entre los sitios activos de la enzima y los mediadores redox.

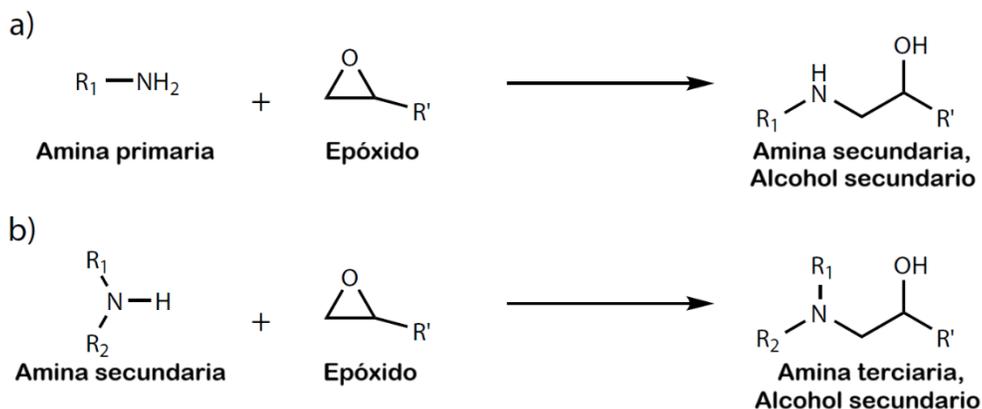


Figura 37. Reacciones de aminas a) primarias y b) secundarias con epóxidos<sup>91</sup>.

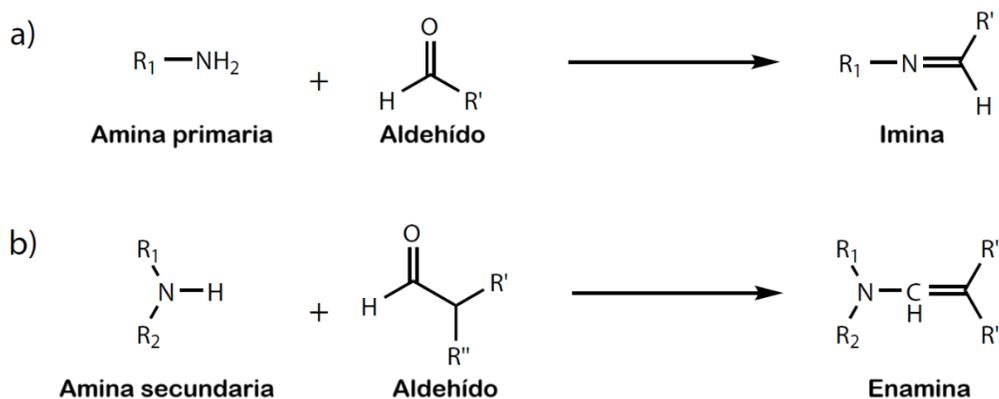


Figura 38. Reacciones de aminas a) primarias y b) secundarias con aldehídos<sup>91</sup>.

De esta manera, polímeros con grupos amino como la poli-etilenimina ramificada (BPEI presenta en su estructura aminas primarias, secundarias y terciarias) son entrecruzados con EGDGE o con GA y con la enzima (GOx) de interés<sup>91</sup>. Como resultado de este procedimiento se obtienen hidrogeles BPEI/GOx/EGDGE y BPEI/GOx/GA de primera generación, que posteriormente se depositan sobre el electrodo de trabajo. En la presencia del sustrato, las enzimas iniciarán con la reacción 1.5 que se menciona anteriormente. La detección de glucosa se realiza a través de la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Por otro lado, actualmente el grupo de trabajo colabora con el Dr. Fernando Battaglini y la Dra. Lucy

Coria del INQUIMAE-UBA, quienes han desarrollado un sistema con poli-etilenimina ramificada (BPEI), modificada con diferentes compuestos de Os. Los compuestos resultantes son Os(bpy)2Cl(pyCOH) unido covalentemente a BPEI (OsBPEI), con  $E^0$  de 0.3 V vs Ag|AgCl (Figura 39) y Os(dcbpy)2Cl(pyCOH) unido covalentemente a BPEI (OsCOOHBPEI), con  $E^0$  de 0.45 V vs Ag|AgCl (Figura 40). Es importante mencionar que algunas de las ventajas de los polímeros basados en complejos de osmio con ligandos heterocíclicos son, estabilidad en ambos estados de oxidación, presentan una cinética de intercambio electrónico rápida con las enzimas y con la superficie del electrodo<sup>93</sup>. Por otro lado, los polímeros redox tienen en su estructura aminas primarias, secundarias y terciarias<sup>93</sup>, útiles para incorporar diferentes estructuras<sup>90</sup>.

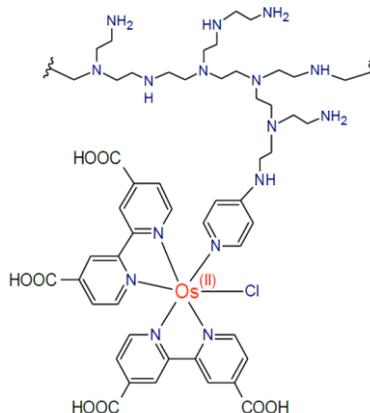


Figura 39. Estructura química del polímero redox OsCOOHBPEI<sup>93</sup>.

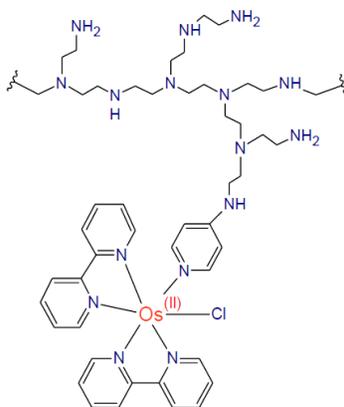
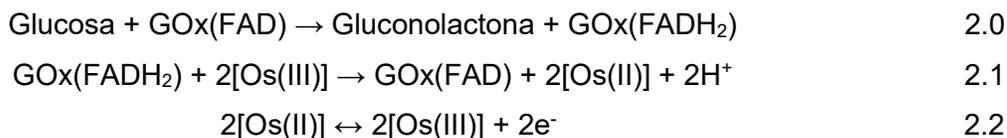


Figura 40. Estructura química del polímero redox OsBPEI<sup>93</sup>.

Los polímeros son entrecruzados con EGDGE o con GA y con la enzima (GOx) de interés. Como resultado de este procedimiento se obtienen hidrogeles OsBPEI/GOx/EGDGE o GA y OsCOOHBPEI/GOx/EGDGE o GA de segunda generación, que posteriormente se depositan sobre el

electrodo de trabajo. En la presencia del sustrato, las enzimas reducirán el Os (III) a Os (II), estableciendo un ciclo catalítico que incrementa la corriente observada con respecto a la concentración del sustrato por VC<sup>92,93</sup>.

Biosensor de glucosa:



Es necesario evaluar biosensores enzimáticos de primera y segunda generación y la composición más adecuada para la formación de un hidrogel con mayor sensibilidad y estabilidad para detectar glucosa en medios de cultivo celular.

### 3.5.1 Biosensores enzimáticos de primera generación

Actualmente el grupo de trabajo evalúa y caracteriza un biosensor de primera generación basado en BPEI entrecruzada con GA/EGDGE y la enzima glucosa oxidasa (GOx). Se han obtenido buenos resultados en la detección de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4. Sin embargo, es necesario analizar si son adecuados para detectar glucosa en matrices complejas como el medio de cultivo<sup>90</sup>.

Para la elaboración de los hidrogeles de primera generación inicialmente se realiza la preparación de las siguientes soluciones:

- Glucosa ( $\beta$ -D-Glucosa, Sigma Aldrich,  $\geq 99.5$  %): es necesario preparar la solución de glucosa con 24 h de anticipación para permitir su estabilización. Se prepara una solución 1 M de glucosa en el buffer de fosfatos 0.1 M con pH 7.4. A partir de esta solución se hacen diluciones 0-100 mM para realizar las curvas de calibración. La solución se debe mantener a una temperatura de  $-4$  °C.
- GOx (origen: *A. niger*, Sigma Aldrich, 100,000-250,000 unidades/g): se prepara una solución de 5 mg/ml en el buffer de fosfatos 0.1 M con pH 7.4. Es necesario resguardar la solución a una temperatura de  $-20$  °C.
- GA (Sigma Aldrich 50 wt. %): se prepara una solución al 4.5 % en agua ultrapura.
- EGDGE (Sigma Aldrich 100 %): se prepara una solución al 7.5 % en agua ultrapura.
- BPEI: se prepara una solución de 10 mg/ml en agua ultrapura.

Antes de preparar el hidrogel es necesario limpiar adecuadamente el electrodo de trabajo como se indica en la sección 3.4.3.1 (se utilizaron los chips descritos en la sección 3.4.3). En el manejo de estos electrodos se utilizó VC como un paso extra en la limpieza de la superficie del WE, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 mM en una ventana de potencial de -0.55 a 1.2 V.

Tabla 2. Composición de hidrogeles enzimáticos de primera generación

BPEI/GOx/GA	BPEI/GOx/EGDGE
8.75 µL de una solución 10 mg/ml de BPEI	17.5 µL de una solución 10 mg/ml de BPEI
3.75 µL de una solución 5 mg/ml de GOx	7.5 µL de una solución 5 mg/ml de GOx
0.9 µL de una solución al 4.5 % de GA	0.95 µL de una solución al 7.5 % de EGDGE

### 3.5.1.1 Evaluación de biosensores enzimáticos de primera generación en electrodos de oro

Una vez que se tienen las soluciones, se mezcla el polímero con la enzima y se agita en el vortex por 10 s (Tabla 2). Se agrega el entrecruzador y se agita nuevamente por 10 s en el vortex. Inmediatamente se toman 0.15 µL y se depositan sobre el WE de oro (Figuras 41a y 42a). Se coloca el electrodo en el horno de secado (MTI CORP, modelo EQ-DGH) con una temperatura de 30 °C por 20 min. Se retira y se enjuaga con agua ultrapura para eliminar el exceso de polímero que no se unió a la superficie. y se seca por 10 min antes de ser evaluado en el microscopio óptico (Microscopio invertido, Nikon Eclipse Ti) como se observa en las Figuras 41b y 42b. Finalmente, con los electrodos modificados con BPEI/GOx/GA o BPEI/GOx/EGDGE, se evalúan soluciones de glucosa entre 0-100 mM en PB 0.1 M pH 7.4 o medio de cultivo RPMI-1640 con 0 - 5 % SFB por voltamperometría cíclica (VC) y cronoamperometría (CA). A través de las evaluaciones por VC (100 mV/s) se identificó el potencial de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adicionalmente, se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración, donde se tomó la corriente de cada cronoamperograma en t = 120 s.

Una vez que se realizó el depósito de los hidrogeles BPEI/GOx/GA al 0.45 % y BPEI/GOx/EGDGE al 7.5 % sobre el WE, se evalúa el potencial de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada electrodo. Se realizó VC con una ventana de potencial desde -0.1 a 0.5 V en PB 0.1 M pH 7.4 con 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De acuerdo con los resultados observados en el voltamperograma (Figura 43) se seleccionó 0.5 V para realizar las evaluaciones por CA, logrando estabilidad de corriente con 120 s.

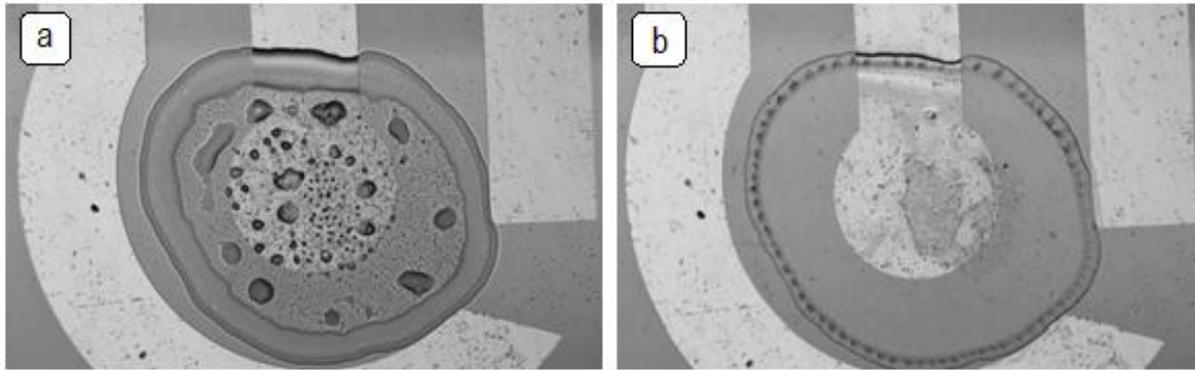


Figura 41. Microscopia óptica (4X) del depósito de hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % sobre el WE antes (a) y después (b) de enjuagar para retirar el exceso de polímero.

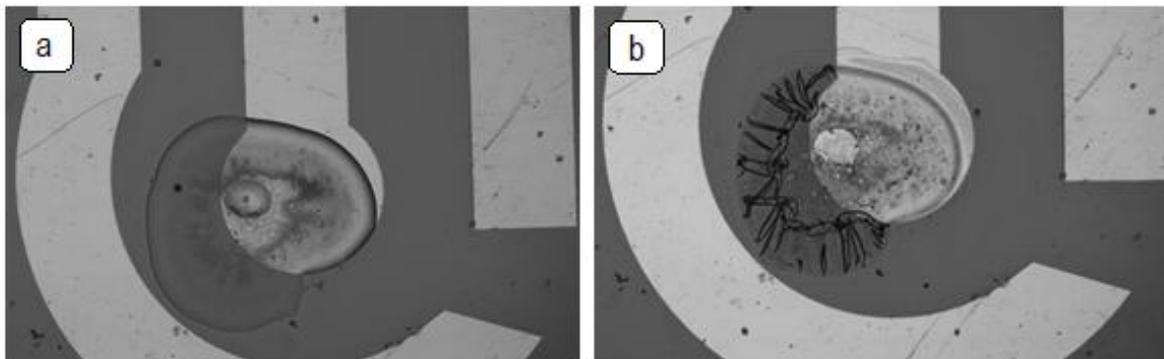


Figura 42. Microscopia óptica (4X) del depósito de hidrogel BPEI/GOx/EGDGE 7.5 % sobre el WE antes (a) y después (b) de enjuagar para retirar el exceso de polímero.

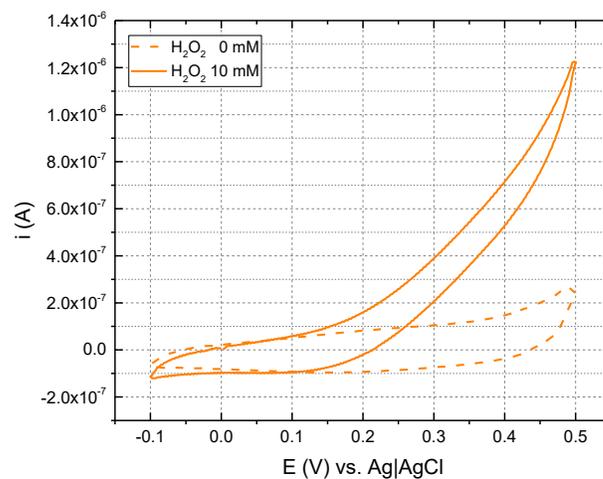


Figura 43. Voltamperograma cíclico en PB 0.1 M pH 7.4 para determinar el potencial de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en BPEI/GOx/GA al 0.45 %.

Posteriormente se evaluó la actividad enzimática de los hidrogeles depositados a través de CA (0.5 V). Inicialmente se trabajó con el entrecruzador GA. Se realizaron curvas de calibración con concentraciones de glucosa entre 0 - 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4. Se evaluaron muestras de 35  $\mu$ L de cada solución por triplicado y se realizó VC para corroborar la estabilidad del depósito del hidrogel. En la Figura 44 se observa un aumento en la señal ( $8.78 \times 10^{-7}$  A) de la solución con una concentración 10 mM de glucosa, corroborando la actividad enzimática del hidrogel depositado.

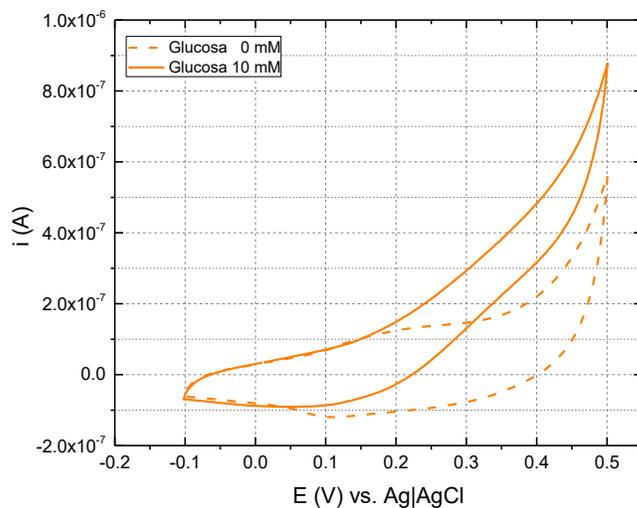


Figura 44. Voltamperograma cíclico con el hidrogel BPEI/GOx/GA al 0.45 % para verificar la actividad enzimática con una solución de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4.

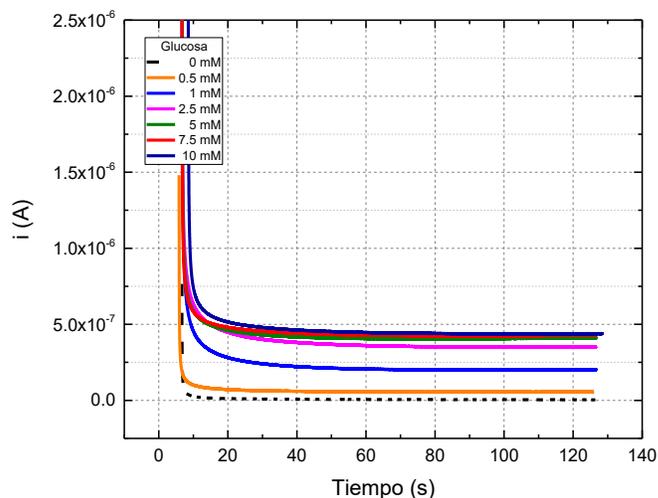


Figura 45. Cronoamperogramas de las evaluaciones con el depósito de hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % con glucosa 0 - 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4.

Posteriormente, se realizó una curva de calibración con concentraciones de glucosa entre 0 – 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4. En la Figura 45 se observa la recopilación de los datos obtenidos de los cronoamperogramas. En la primera evaluación se observa un incremento gradual de corriente con el aumento de la concentración de glucosa, sin embargo, en las últimas evaluaciones se tiene una pérdida de la señal correspondiente al 99.8 %, razón por la cual incrementa significativamente la desviación estándar (Figura 46). Posteriormente se analizó el depósito por microscopía óptica, donde se observa pérdida del hidrogel (Figura 47).

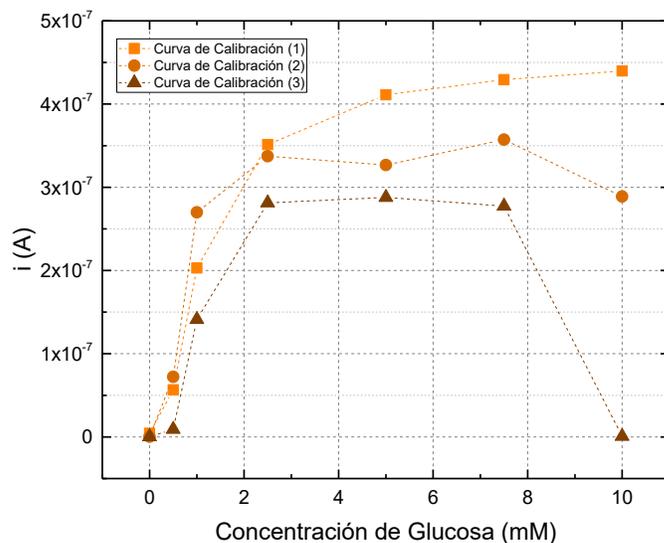


Figura 46. Curvas de calibración obtenidas con el hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % con una glucosa 0 - 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4. Evaluación cronoamperométrica.

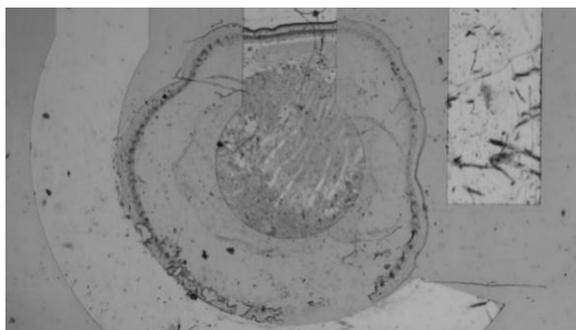


Figura 47. Microscopía óptica (4X) del depósito de hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % después de realizar curvas de calibración con glucosa 0 - 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4.

Bajo estas condiciones, para el hidrogel BPEI/GOx/GA al 0.45 % se determinó un rango lineal entre 0 - 2.5 mM ( $R^2 = 0.92$ ), LOQ de 0.242 mM y una sensibilidad de  $1 \times 10^{-7}$  A/mM. Es necesario realizar

modificaciones en la metodología que permitan incrementar la sensibilidad y el rango lineal para que los biosensores sean capaces de detectar variaciones en medios de cultivo donde se tienen concentraciones de glucosa entre 5 - 10 mM.

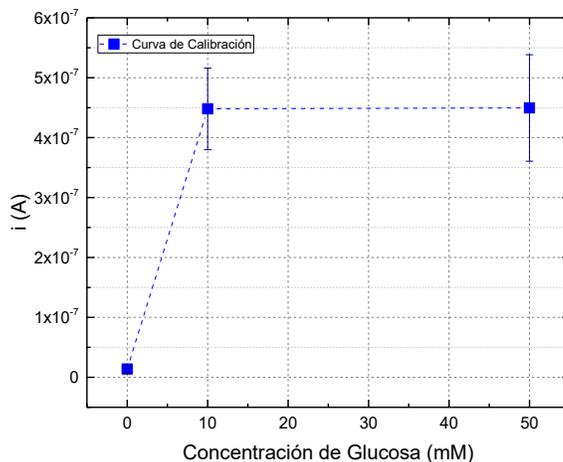


Figura 48. Evaluaciones con el hidrogel BPEI/GOx/EGDGE 7.5 % con glucosa 0, 10 y 50 mM en PB 0.1 M pH 7.4. Evaluación cronoamperométrica.

Por otro lado, en las evaluaciones con el entrecruzador EGDGE se observó la pérdida gradual de la señal después de cada análisis. Por tal motivo se analizaron únicamente tres concentraciones de glucosa 0, 10 y 50 mM (Figura 48), para observar el comportamiento del sistema. Se evaluó el hidrogel por microscopía óptica y se observó la pérdida aproximada del 50 % del depósito (Figura 49). A pesar de que la pérdida que se presentó fue en mayor porcentaje sobre la superficie de vidrio, tras evaluaciones posteriores se perdió por completo el depósito. Se realizó la evaluación con tres depósitos diferentes y se observó el mismo comportamiento.

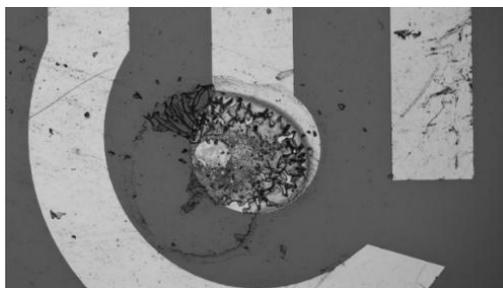


Figura 49. Microscopía óptica (4X) del depósito de hidrogel BPEI/GOx/EGDGE 7.5 % sobre el WE después de evaluaciones de soluciones con glucosa 0, 10 y 50 mM.

Considerando que uno de los objetivos principales del proyecto es la integración de biosensores en un sistema que permita emular un entorno fisiológico para representar el comportamiento celular del microambiente tumoral en el cáncer de mama; es necesario caracterizar el tipo de soporte celular, el medio de cultivo suplementado y su interacción con los sistemas de detección integrados. Por lo tanto, es de nuestro interés conocer el funcionamiento del hidrogel en los medios de cultivo reportados para el crecimiento de las líneas celulares que se utilizarán, enfocándonos en el medio de cultivo RPMI 1640 que presentó buenos resultados con todas las líneas celulares evaluadas.

Se evaluó el comportamiento del hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % en el medio RPMI 1640 con diferentes concentraciones de glucosa (0 - 10 mM), sin suplementos adicionales. En la Figura 50 se observa que no es posible diferenciar el incremento en la concentración de glucosa. Adicionalmente, en comparación con los resultados para la concentración 0 mM como se observa en las Figuras 43 – 44, este sistema presenta una señal de  $2 \times 10^{-8}$  A, posiblemente por la adsorción de algún interferente electroactivo del medio de cultivo, que también evita la difusión del  $H_2O_2$  a la superficie del WE impidiendo la detección de glucosa.

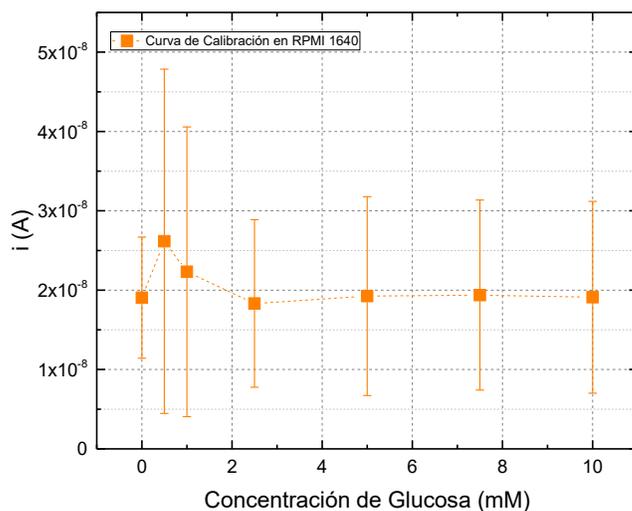


Figura 50. Curva de calibración obtenida con el hidrogel BPEI/GOx/GA 0.45 % con glucosa 0 - 10 mM en el medio de cultivo RPMI 1640. Evaluación cronoamperométrica.

Posteriormente se analizó una solución de  $H_2O_2$  10 mM en PB 0.1 M y en medio de cultivo RPMI 1640 sobre el WE de oro sin el depósito del hidrogel, para evaluar si algún compuesto del medio de cultivo interfiere en el potencial utilizado. Se puede observar claramente la pérdida de la señal (99.20 %) del  $H_2O_2$  10 mM cuando se analiza en el medio de cultivo (Figura 51), posiblemente por la adsorción de algún componente sobre la superficie de oro. De acuerdo con la composición del medio RPMI 1640

(Sección 7.3) es posible encontrar compuestos tiolados, como el glutatión, que suelen adsorberse en superficies de oro. Por esta razón es necesario evaluar WE que no presenten interferencias en medios complejos.

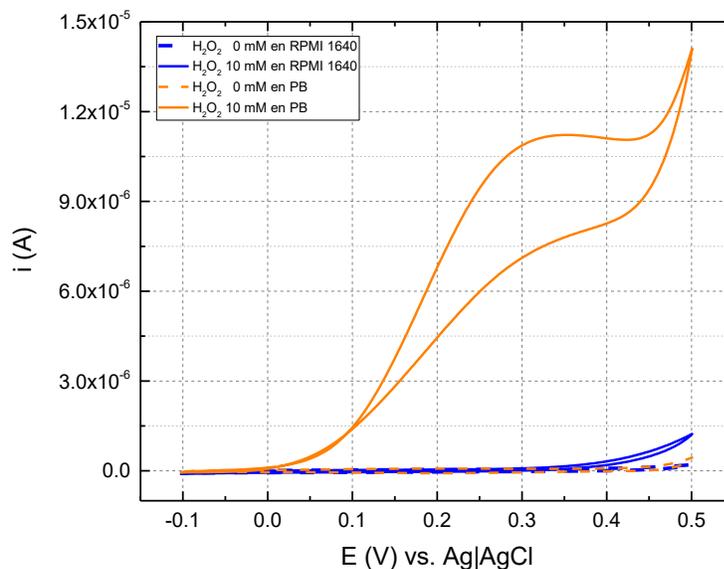


Figura 51. Voltamperogramas cíclicos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PB 0.1 M pH 7.4 y en el medio de cultivo RPMI 1640 sobre un WE de oro.

### 3.5.1.2 Evaluación de biosensores enzimáticos de primera generación en electrodos serigrafados de carbono

Como se menciona en la sección anterior, las evaluaciones que se realizaron en medio de cultivo RPMI 1640 de los biosensores enzimáticos de primera generación en oro no fue satisfactoria. No fue posible detectar glucosa en electrodos de oro. Sin embargo, para identificar si la adsorción de interferentes en la superficie de oro es el único problema, se evaluaron los sistemas BPEI/GOx/GA 33.3 mM (Figura 52) y BPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM (Figura 53) en los electrodos serigrafados de carbono (SPE). No obstante, en ninguno de los sistemas es posible detectar glucosa en medio de cultivo RPMI 1640. Dentro de los interferentes presentes en el medio, también hay elementos electroactivos que bloquean la difusión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y no se observa un incremento de corriente proporcional al incremento de la concentración de glucosa. Por lo tanto, el sistema no es adecuado para evaluar glucosa en medios de cultivo celular.

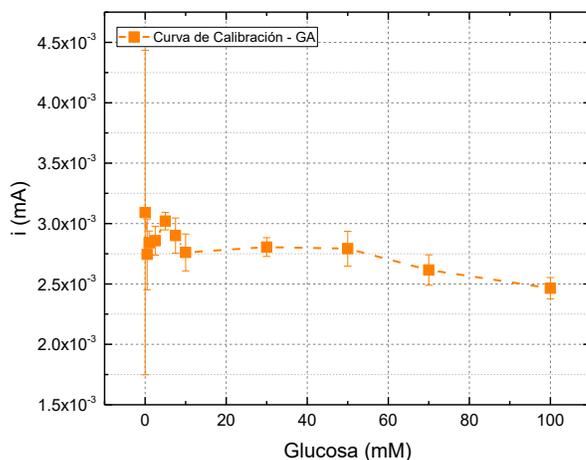


Figura 52. Curva de calibración de glucosa 0 - 100 mM en medio de cultivo RPMI 1640 en el sistema BPEI/GOx/GA 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica n=3.

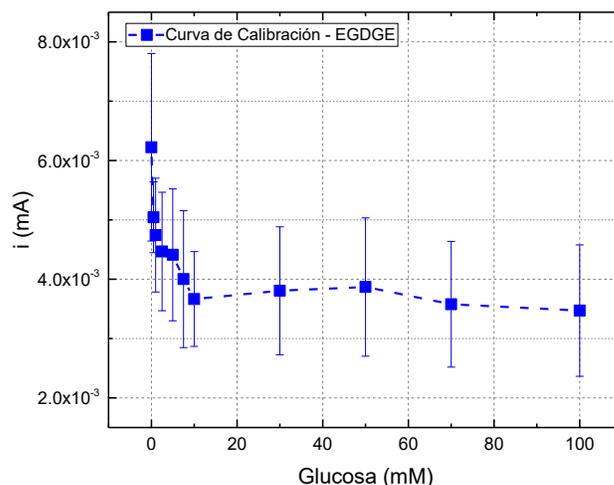


Figura 53. Curva de calibración de glucosa 0 - 100 mM en medio de cultivo RPMI 1640 en OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica n=3.

Es importante mencionar que en las evaluaciones de biosensores de primera generación se emplean potenciales más altos y esto puede favorecer los inconvenientes generados por interferentes como glutatión, ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU), ácido láctico (AL), etc. Por otra parte, es probable que moléculas absorbidas en el hidrogel dificulten la difusión de glucosa y repercuta en la función del biosensor como se ilustra en la Figura 54a. Sin embargo, consideramos que en los biosensores de segunda generación este efecto será eliminado por la función del mediador como se ilustra en la Figura 54b.

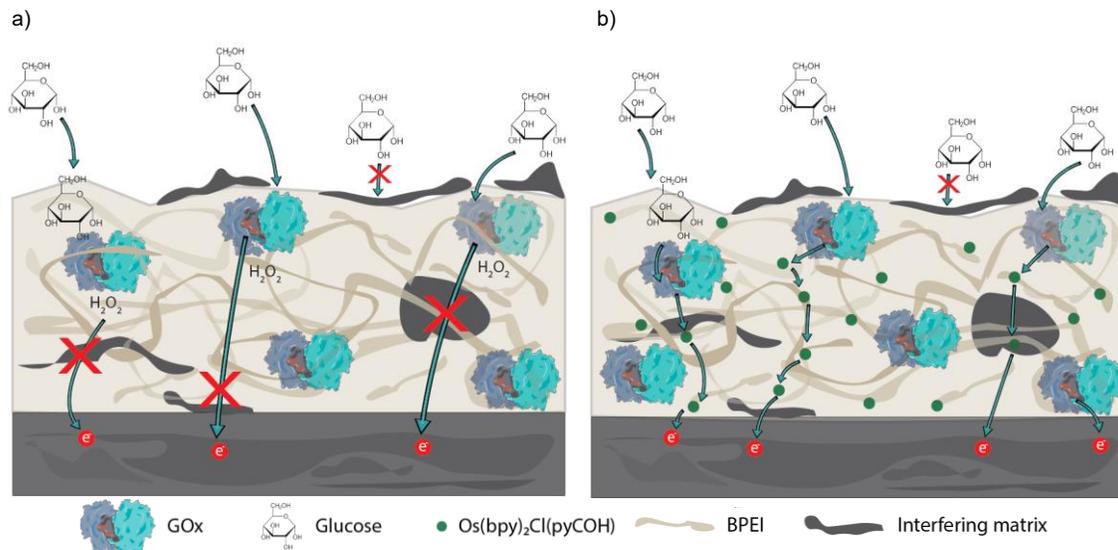


Figura 54. a, b) Esquemas de los efectos de adsorción/absorción de los componentes del medio sobre el mecanismo de transferencia de carga de biosensores de a) primera y b) segunda generación.

Siendo el objetivo principal el desarrollo de un biosensor económico y estable, capaz de detectar glucosa de manera continua en medios de cultivo celular, se consideró importante realizar evaluaciones adicionales para comprender con mayor profundidad el problema con el funcionamiento de los biosensores enzimáticos de primera generación en medio de cultivo. Inicialmente se evaluó el potencial de oxidación del  $H_2O_2$  en PB 0.1 M pH 7.4 sobre un SPE de carbono sin modificación. Posteriormente, se evaluaron concentraciones entre 0 – 100 mM de  $H_2O_2$  en PB 0.1 M pH 7.4 sobre SPE modificados con BPEI/GOx/GA o BPEI/GOx/EGDGE, en donde se observa un comportamiento similar con ambos entrecruzadores (Figura 55a) y es posible detectar  $H_2O_2$ . Se realizaron también las evaluaciones de  $H_2O_2$  0 – 100 mM en medio de cultivo RPMI-1640, donde es posible detectar  $H_2O_2$ , sin embargo, las corrientes obtenidas fueron 10 veces menores en comparación con las evaluaciones en PB (Figura 55b). Adicionalmente, se evaluaron soluciones con concentraciones de glucosa entre 0 – 100 mM en medio de cultivo RPMI-1640 (Figura 55b), donde no es posible detectar glucosa. Probablemente, debido a la presencia de interferentes y siendo una molécula más grande en comparación con el  $H_2O_2$ , no sea posible la difusión de glucosa y, por lo tanto, no es posible llevar a cabo la reacción.

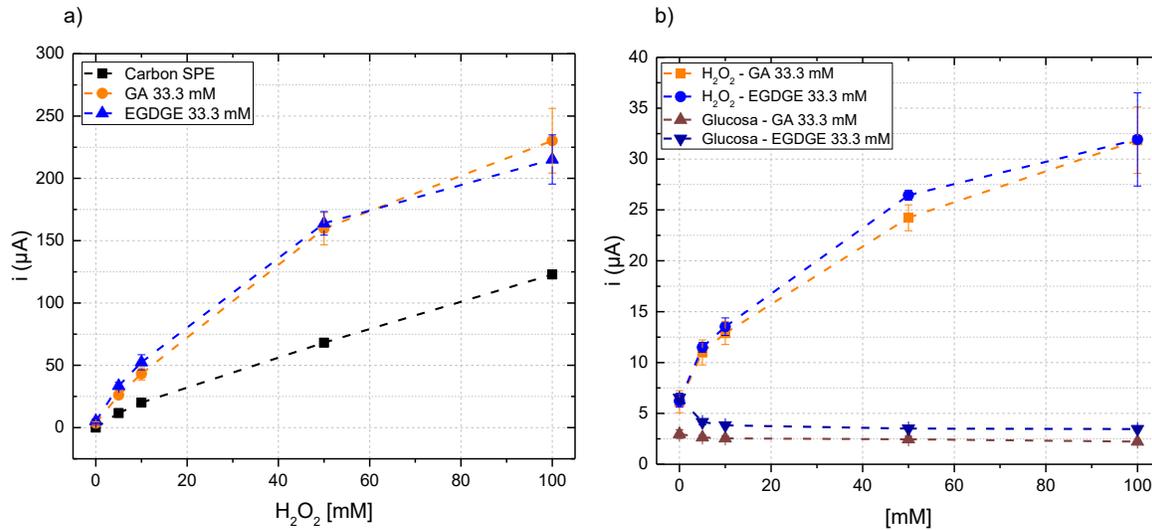


Figura 55. Evaluación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0 – 100 mM en SPE y SPE modificados con BPEI/GOx/GA y BPEI/GOx/EGDGE en a) PB 0.1 M pH 7.4 y b) medio de cultivo RPMI con 5 % SFB.

Por otra parte, es importante mencionar que el grupo de trabajo se ha dedicado a la optimización y caracterización de este sistema. Actualmente se realizan las evaluaciones con cambios en la composición de los hidrogeles. Para la preparación de los nuevos hidrogeles de primera generación se realiza el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se mezcla el polímero y el PB con la enzima y se agita en el vortex por 10 s (Tabla 3). Se agrega el entrecruzador y se agita nuevamente por 10 s en el vortex. Obteniendo de esta manera los electrodos modificados con \*BPEI/GOx/GA o \*BPEI/GOx/EGDGE, donde se evalúan soluciones de glucosa o  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 0 - 100 mM en PB 0.1 M pH 7.4 o medio de cultivo RPMI-1640 con 0 - 5 % SFB.

Tabla 3. Composición actual de hidrogeles enzimáticos de primera generación

*BPEI/GOx/GA	*BPEI/GOx/EGDGE
8.75 $\mu\text{L}$ de una solución 10 mg/ml de BPEI	17.5 $\mu\text{L}$ de una solución 10 mg/ml de BPEI
2.68 $\mu\text{L}$ de una solución 5 mg/ml de GOx	5.19 $\mu\text{L}$ de una solución 5 mg/ml de GOx
0.93 $\mu\text{L}$ de una solución al 4.5 % de GA	1.79 $\mu\text{L}$ de una solución al 7.5 % de EGDGE
1.04 $\mu\text{L}$ de PB 0.1 M pH 7.4	1.47 $\mu\text{L}$ de PB 0.1 M pH 7.4

En las evaluaciones con concentraciones de glucosa entre 0 – 100 mM en PB 0.1 M pH 7.4 se observó que presentan corrientes 3 veces mayores (Figura 56) en comparación con la composición inicial de los hidrogeles de primera generación (Figuras 46 y 48).

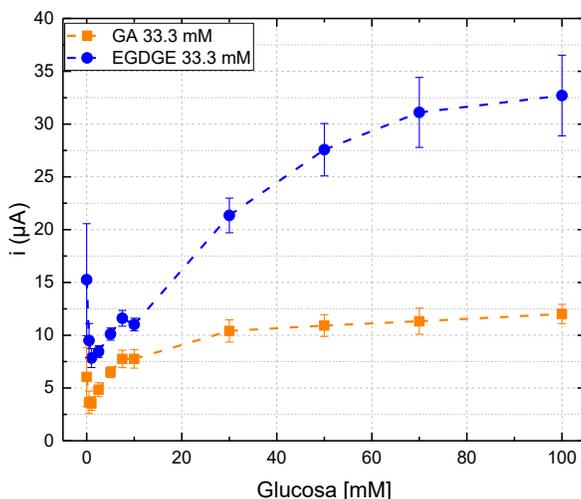


Figura 56. Curvas de calibración de glucosa 0 – 100 mM en PB 0.1 M, pH 7.4, basadas en evaluaciones cronoamperométricas utilizando hidrogel \*BPEI/GOx/GA y \*BPEI/GOx/EGDGE. Evaluaciones realizadas en electrodos independientes.

Para analizar el comportamiento de estos hidrogel se realizaron las mismas evaluaciones descritas anteriormente. Inicialmente se evaluó el potencial de oxidación del  $H_2O_2$  en PB 0.1 M pH 7.4 sobre un SPE de carbono. Posteriormente, se evaluaron concentraciones entre 0 – 100 mM de  $H_2O_2$  en PB 0.1 M pH 7.4 sobre SPE modificados con \*BPEI/GOx/GA o \*BPEI/GOx/EGDGE, en donde se observan mayores corrientes con el entrecruzador GA (Figura 57a). Se realizaron también las evaluaciones de  $H_2O_2$  0 – 100 mM en medio de cultivo RPMI-1640, donde es posible detectar  $H_2O_2$  y se presentan mayores corrientes con EGDGE. Sin embargo, las corrientes obtenidas fueron 4 veces menores con EGDGE y 6 veces menores con GA, en comparación con las evaluaciones en PB (Figura 57b). Adicionalmente, se evaluaron soluciones con concentraciones de glucosa entre 0 – 100 mM en medio de cultivo RPMI-1640 (Figura 57b), donde se observa un incremento de corriente proporcional al incremento en la concentración de glucosa. Es importante mencionar que los valores de las señales obtenidas son aproximadamente 10 veces mayores en comparación a la detección de glucosa con los hidrogel BPEI/GOx/EGDGE y GA en PB 0.1 M pH 7.4. Sin embargo, también se observa que el blanco presenta una señal al igual que en las evaluaciones anteriores en medio de cultivo. Este factor puede repercutir considerablemente sobre la estabilidad del biosensor y es necesario realizar evaluaciones más detalladas para definir si es factible usar estos biosensores por tiempos prolongados en medios complejos. Por lo tanto, se evaluarán biosensores de segunda generación para definir si es factible mejorar la estabilidad y sensibilidad en la detección de glucosa en medios de cultivo celular.

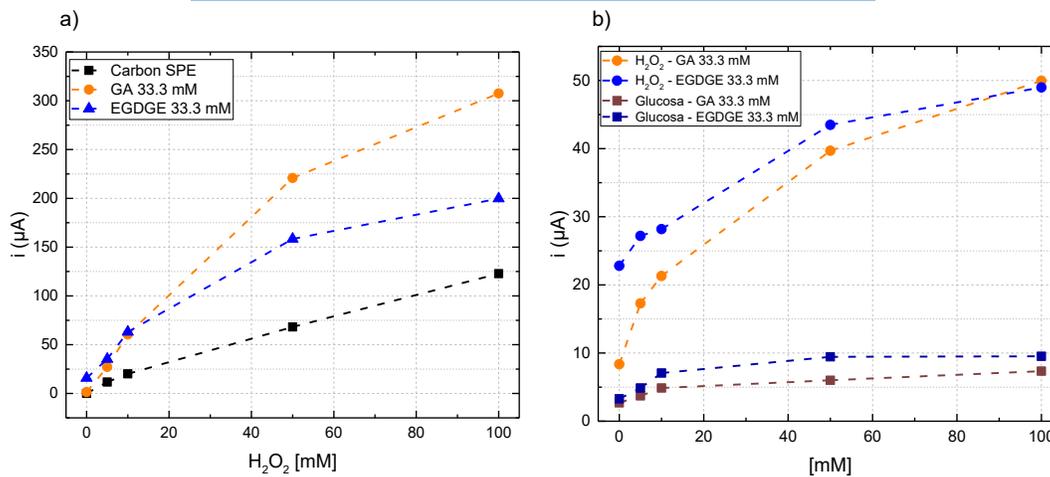


Figura 57. Evaluación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0 – 100 mM en SPE y SPE modificados con \*BPEI/GOx/GA y \*BPEI/GOx/EGDGE en a) PB 0.1 M pH 7.4 y b) medio de cultivo RPMI con 5 % SFB.

### 3.5.2 Biosensores enzimáticos de segunda generación

Inicialmente se realiza la preparación de soluciones para la elaboración de los hidrogeles y su depósito:

- Glucosa ( $\beta$ -D-Glucosa, Sigma Aldrich,  $\geq 99.5\%$ ): es necesario preparar la solución de glucosa con 24 h de anticipación para permitir su estabilización. Se prepara una solución 1 M de glucosa en el buffer de fosfatos 0.1 M con pH 7.4. A partir de esta solución se hacen diluciones 0-100 mM para realizar las curvas de calibración. La solución se debe mantener a una temperatura de  $-4\text{ }^\circ\text{C}$ .
- GOx (origen: *A. niger*, Sigma Aldrich, 100,000-250,000 unidades/g): se prepara una solución de 5 mg/ml en el buffer de fosfatos 0.1 M con pH 7.4. Es necesario resguardar la solución a una temperatura de  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .
- GA (Sigma Aldrich 50 wt. %): se prepara una solución 66.6 mM en agua ultrapura.
- EGDGE (Sigma Aldrich 100 %): se prepara una solución 66.6 mM en agua ultrapura.
- OsBPEI: 2.58 mM (Os), relación osmio:amina 1:12. Solución entregada por el equipo de investigación del INQUIMAE-UBA.
- OsCOOH-BPEI: 3.12 mM (Os), relación osmio:amina 1:19. Solución entregada por el equipo de investigación del INQUIMAE-UBA

Posteriormente, para la preparación del hidrogel, según la concentración deseada (Tabla 4); se mezcla el polímero con la enzima y agua ultrapura, se agita en el vortex por 10 s. Se agrega el entrecruzador de interés y se agita nuevamente por 10 s en el vortex. Inmediatamente se toman  $0.15\text{ }\mu\text{l}$  para los

chips de oro policristalino o 3  $\mu\text{l}$  para los chips serigrafiados de carbono y se depositan sobre el WE. Se coloca el chip en el horno de secado (MTI CORP, modelo EQ-DGH) con una temperatura de 30 °C por 20 min para los chips de oro policristalino o 1 h para los chips serigrafiados de carbono. Se retira y se enjuaga con agua ultrapura para eliminar el exceso de polímero que no se unió a la superficie. Finalmente, con los electrodos modificados con OsBPEI/GOx/GA o OsBPEI/GOx/EGDGE, se evalúan soluciones de glucosa entre 0-100 mM en PB 0.1 M pH 7.4 o medio de cultivo RPMI-1640 con 0 - 5 % SFB por voltamperometría cíclica (VC) y cronoamperometría (CA). A través de las evaluaciones por VC (100 mV/s) se identificó el potencial de oxidación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Adicionalmente, se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración, donde se tomó la corriente de cada cronoamperograma en  $t = 120$  s.

Tabla 4. Composición del hidrogel

Entrecruzador		Polímero	GOx	Agua
GA/EGDGE 33.3 mM	10 $\mu\text{l}$	OsBPEI		2.3 $\mu\text{l}$
GA/EGDGE 16.5 mM	5 $\mu\text{l}$	3.7 $\mu\text{l}$		7.3 $\mu\text{l}$
GA/EGDGE 3.33 mM	1 $\mu\text{l}$	(0.48 mM)	4 $\mu\text{l}$	11.3 $\mu\text{l}$
GA/EGDGE 33.3 mM	10 $\mu\text{l}$	OsCOOHBPDI	(1 mg/ml)	2.9 $\mu\text{l}$
GA/EGDGE 16.5 mM	5 $\mu\text{l}$	3.1 $\mu\text{l}$		7.9 $\mu\text{l}$
GA/EGDGE 3.33 mM	1 $\mu\text{l}$	(0.48 mM)		11.9 $\mu\text{l}$

### 3.5.2.1 Evaluación de biosensores enzimáticos de segunda generación en electrodos de oro

Se evaluaron biosensores enzimáticos de segunda generación en electrodos de oro policristalino. La fabricación e incorporación de este tipo de electrodos es más amigable en sistemas microfluídicos y era necesario corroborar si se presentaba un cambio al utilizar este sistema. Inicialmente con el sistema OsBPEI/GOx/GA se evaluaron concentraciones de GA de 3.33, 17.5 y 33.3 mM. Se utilizó una solución de glucosa 100 mM en PB 0.1 M pH 7.4 y se corroboró el  $E_{pa}$  (Figuras 58) de cada concentración, los voltamperogramas se realizaron con una velocidad de barrido de 2 mV/s para observar adecuadamente la catálisis de la enzima. Sin embargo, se observa también la oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , factor que debe ser considerado para controlar las condiciones de operación de los experimentos. De acuerdo con las evaluaciones se utilizaron 0.25 V para llevar a cabo la curva de calibración por cronoamperometría. Con los resultados se observó que la concentración de 17.5 mM (Figura 59) presenta corrientes más altas pero una mayor dispersión de datos. La concentración 33.3 mM presentó señales similares a la concentración 3.33 mM, pero una menor desviación estándar y fue la seleccionada para las evaluaciones posteriores. Adicionalmente, es importante mencionar que

los experimentos se realizaron por triplicado utilizando el mismo electrodo para cada concentración, se observa una pérdida considerable de la señal tras cada curva de calibración, factor que incrementa la desviación estándar en cada evaluación y que representa la estabilidad del sistema.

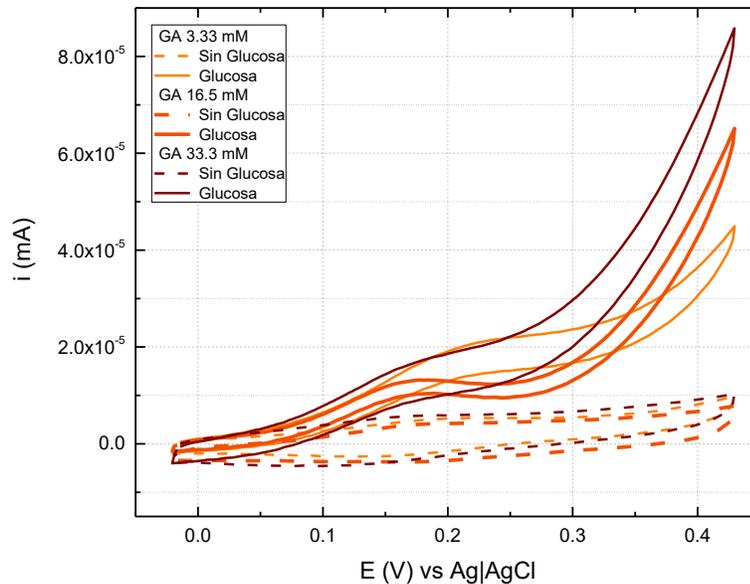


Figura 58. Voltamperogramas cíclicos del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM con concentraciones de GA de 3.33, 17.5 y 33.3 %, para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. WE = oro.

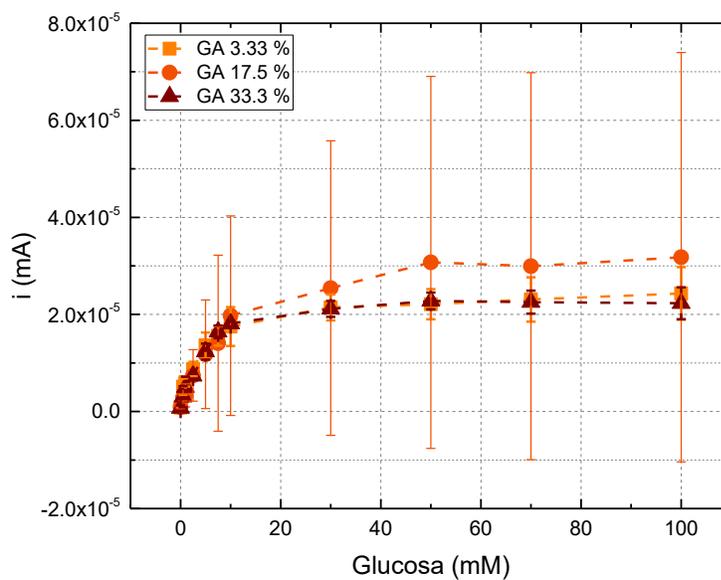


Figura 59. Curva de calibración de glucosa 0 - 100 mM en el sistema OsBPEI/GOx/GA con concentraciones de GA 3.33, 17.5 y 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica (WE = oro).

De acuerdo con la sección 3.5.1.1 donde se evalúan biosensores enzimáticos de primera generación en oro, al evaluar el sistema con el entrecruzador EGDGE se observó una baja estabilidad por la pérdida del depósito. Se realizó una evaluación con el sistema OsBPEI/GOx/EGDGE, sin embargo, se observó el mismo comportamiento. Por esta razón no se realizaron evaluaciones de diferentes concentraciones de EGDGE en electrodos de oro. Sin embargo, se realizaron las evaluaciones de los dos entrecruzadores en medio de cultivo RPMI 1640 para analizar su desempeño.

Con el sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM se observa un aumento en la señal del blanco y es posible detectar glucosa en concentraciones < 5 mM, sin embargo, es notorio que el biosensor pierde su funcionamiento después de realizar algunas evaluaciones, posiblemente por la adsorción de interferentes, afectando directamente la estabilidad del sistema (Figura 60). Por su parte, el sistema OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM presenta un mejor comportamiento. No se observa un aumento en la señal del blanco y es posible detectar glucosa en concentraciones < 30 mM (Figura 60). Sin embargo, se pierde el depósito del hidrogel, impidiendo su uso para evaluaciones prolongadas.

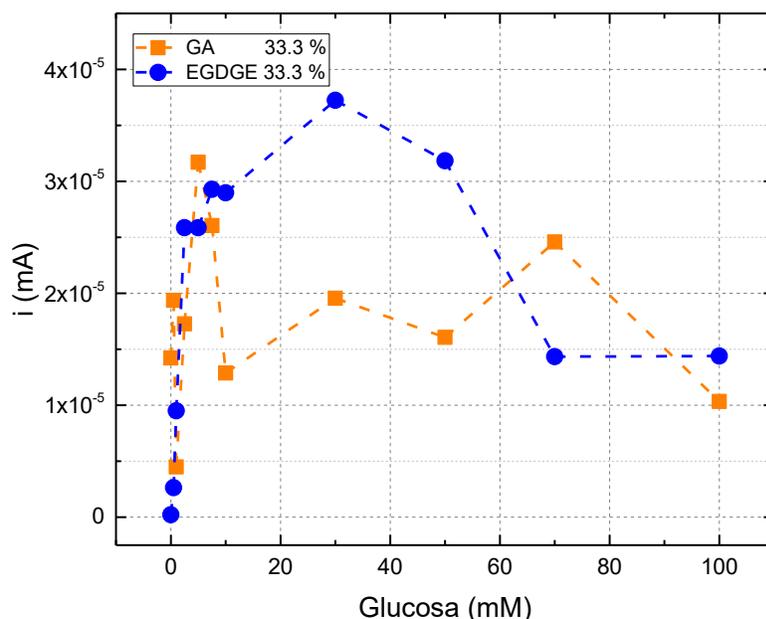


Figura 60. Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM) en medio de cultivo RPMI 1640 sobre el sistema OsBPEI/GOx/GA y OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM en electrodos de oro policristalino. Evaluación cronoamperométrica.

De acuerdo con los resultados, es notorio que los electrodos de oro son susceptibles a los interferentes

presentes en el medio de cultivo. Este factor impacta directamente en la estabilidad y funcionamiento de los biosensores. Por lo tanto, se evaluarán biosensores enzimáticos de segunda generación en electrodos de carbono.

### 3.5.2.2 Evaluación de biosensores enzimáticos de segunda generación en electrodos serigrafiados de carbono

Para la evaluación de electrodos serigrafiados de carbono (SPE) se depositaron 3  $\mu$ l de cada polímero en chips diferentes para evaluar el potencial de oxidación de cada mediador. Se realizó VC en PB 0.1 M pH 7.4, en presencia y ausencia de glucosa, donde se determinó un potencial de oxidación de 0.3294 V para OsBPEI y 0.3794 V (vs. Ag|AgCl) para OsCOOHBPEI. Posteriormente, se realizó el depósito de hidrogeles en 4 chips serigrafiados, donde se evaluaron las siguientes composiciones con soluciones de glucosa entre 0 - 50 mM en PB 0.1 M pH 7.4:

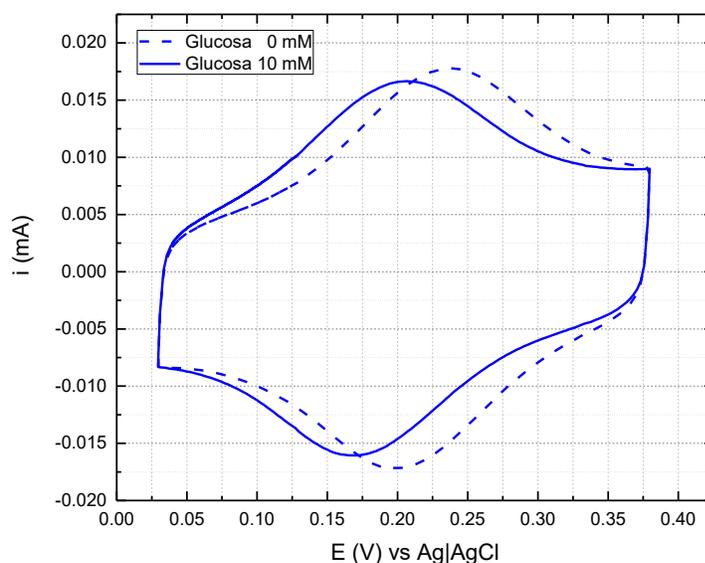


Figura 61. Voltamperograma cíclico del sistema (SPE) OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s.

OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM: se determinó un potencial de oxidación de 0.2092 V con una solución de glucosa 10 mM (Figura 61) y se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración por triplicado en el mismo chip (Figura 62), donde se tomó la corriente de cada cronoamperograma en  $t = 120$  s para reportar los valores de cada experimento. En este sistema se observó la pérdida de un 31.6 % en la señal después de la tercera evaluación. Por otra parte, en el

voltamperograma es evidente que no hay un aumento de corriente con el incremento en la concentración de glucosa y adicionalmente, no se observa la tendencia sigmoïdal característica de los procesos enzimáticos catalíticos, cuestión que podría representar un problema con el sistema (inhibidores, modificación estructural de la enzima, pérdida de enzima en la conformación del hidrogel, etc). Sin embargo, en las evaluaciones cronoamperométricas se observa un incremento de corriente proporcional al incremento en la concentración de glucosa. Por lo tanto, es posible que la velocidad de barrido utilizada en los experimentos no sea adecuada para observar el ciclo catalítico de la enzima, factor que se modificará en experimentos posteriores <sup>67</sup>.

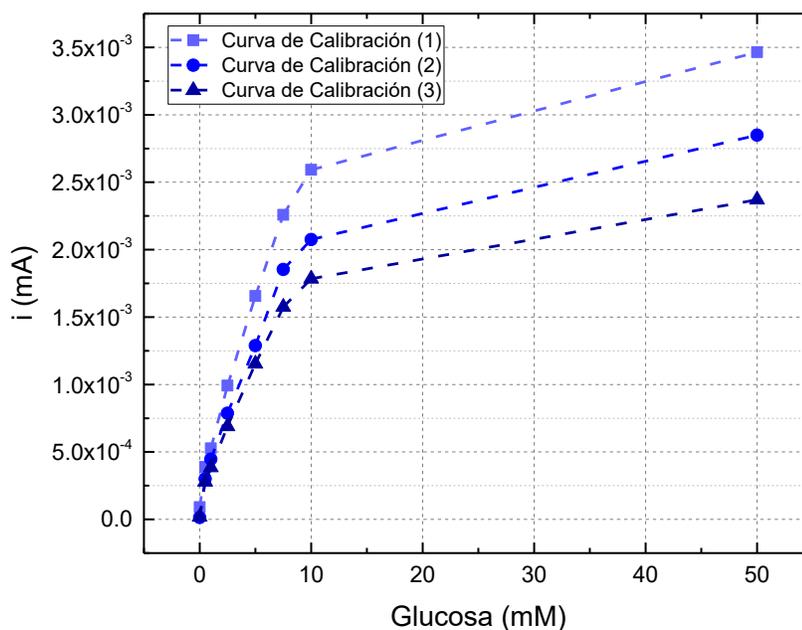


Figura 62. Curva de calibración de glucosa (0 - 50 mM) sobre el sistema OsBPEI/GOx/ EGDGE 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica (SPE).

OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM: se determinó el potencial de oxidación de 0.2151 V con una solución de glucosa 10 mM (Figura 63) y se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración por triplicado en el mismo chip (Figura 64). Se observó la pérdida de un 39.11 % en la señal después de la tercera evaluación y corrientes más bajas en comparación con el sistema de EGDGE. El voltamperograma no muestra la tendencia sigmoïdal característica, sin embargo, es evidente el aumento de corriente con el incremento en la concentración de glucosa.

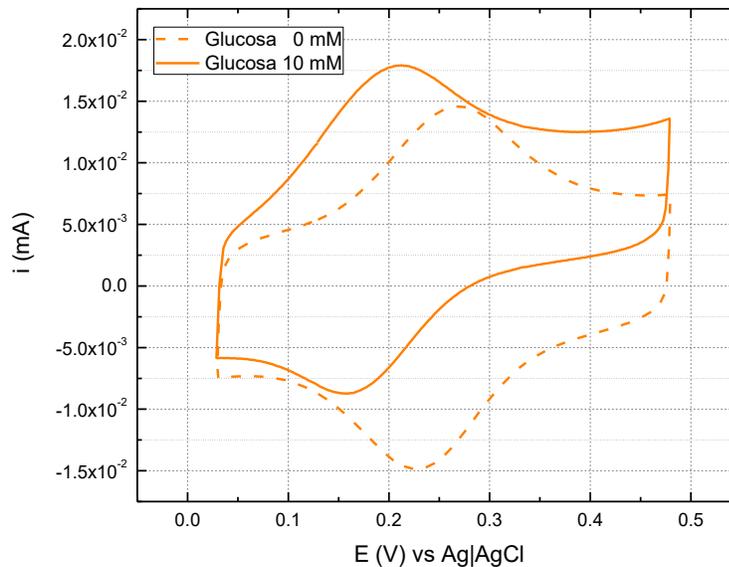


Figura 63. Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolyte soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s.

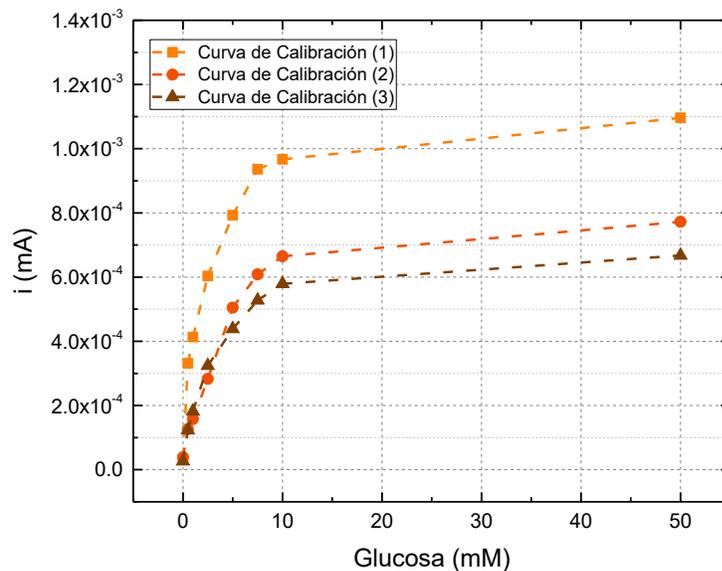


Figura 64. Curva de calibración de glucosa (0 - 50 mM) sobre el sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica (SPE).

OsCOOHBPPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM: se determinó el potencial de oxidación de 0.3057 V con una solución de glucosa 10 mM (Figura 65) y se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración (Figura 66). Sin embargo, en el sistema no se observa una respuesta coherente con el incremento en las concentraciones de glucosa. Por lo tanto, se descartó el uso del mediador. No se realizaron experimentos adicionales para analizar el sistema.

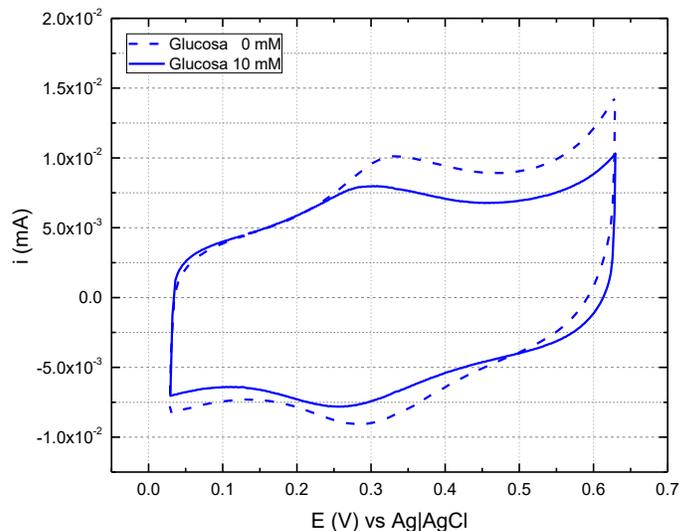


Figura 65. Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEICOOH/GOx/EGDGE 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M, pH 7.4, 100 mV/s.

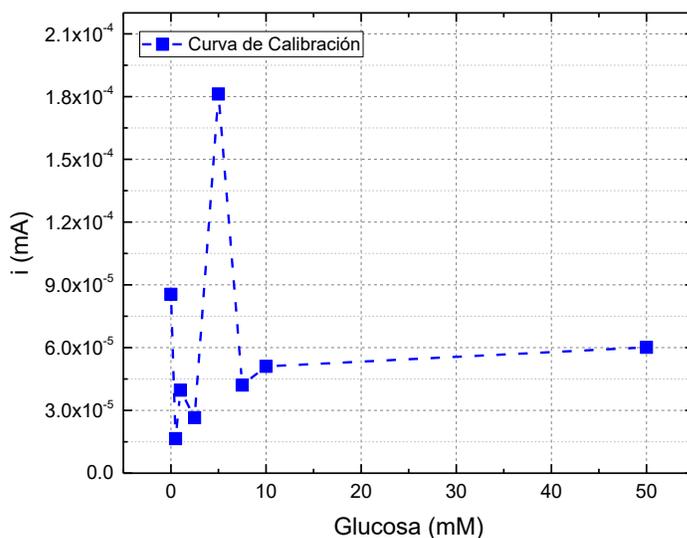


Figura 66. Curva de calibración de glucosa (0-50 mM) sobre el sistema OsBPEICOOH/GOx/EGDGE 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica.

OsCOOHBPEI/GOx/GA 33.3 mM: se determinó el potencial de oxidación de 0.2683 V con una solución de glucosa 10 mM (Figura 67) y se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración (Figura 68). Sin embargo, al igual que en el sistema anterior, no se observa una respuesta coherente con el incremento en las concentraciones de glucosa. De igual manera se descartó el uso del mediador.

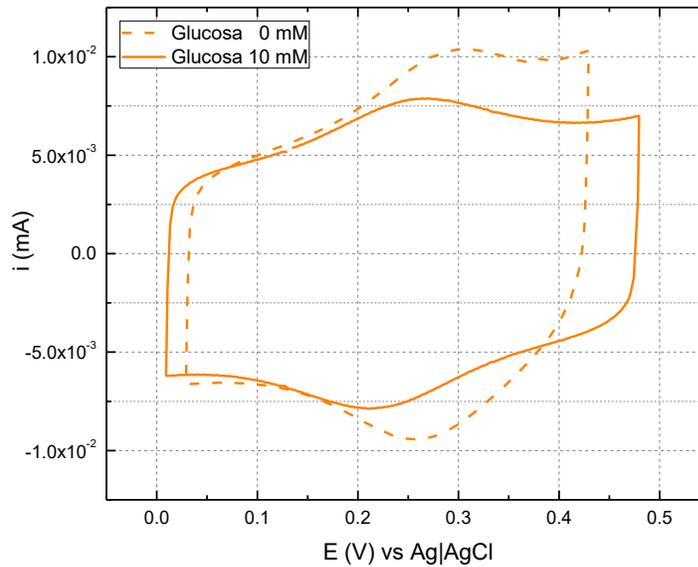


Figura 67. Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEICOOH/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s.

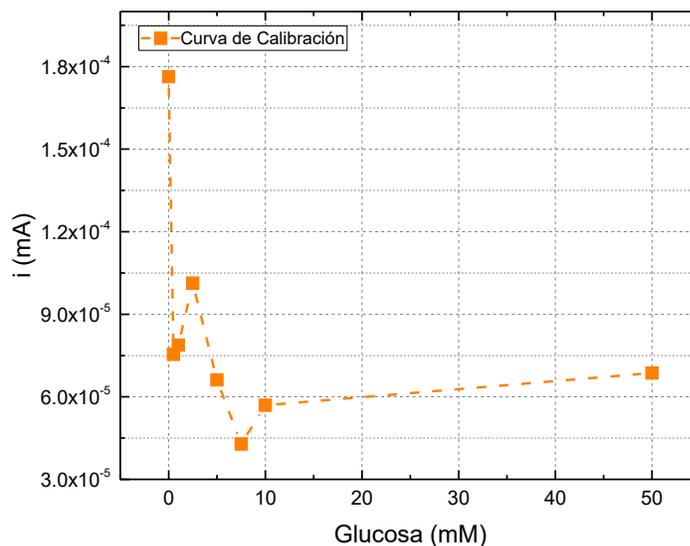


Figura 68. Curva de calibración de glucosa (0-50 mM) sobre el sistema OsBPEICOOH/ GOx/GA 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica.

De acuerdo con los resultados se seleccionó únicamente el polímero OsBPEI para realizar las evaluaciones posteriores. Se evalúan tres diferentes concentraciones de cada entrecruzador para determinar el sistema más estable.

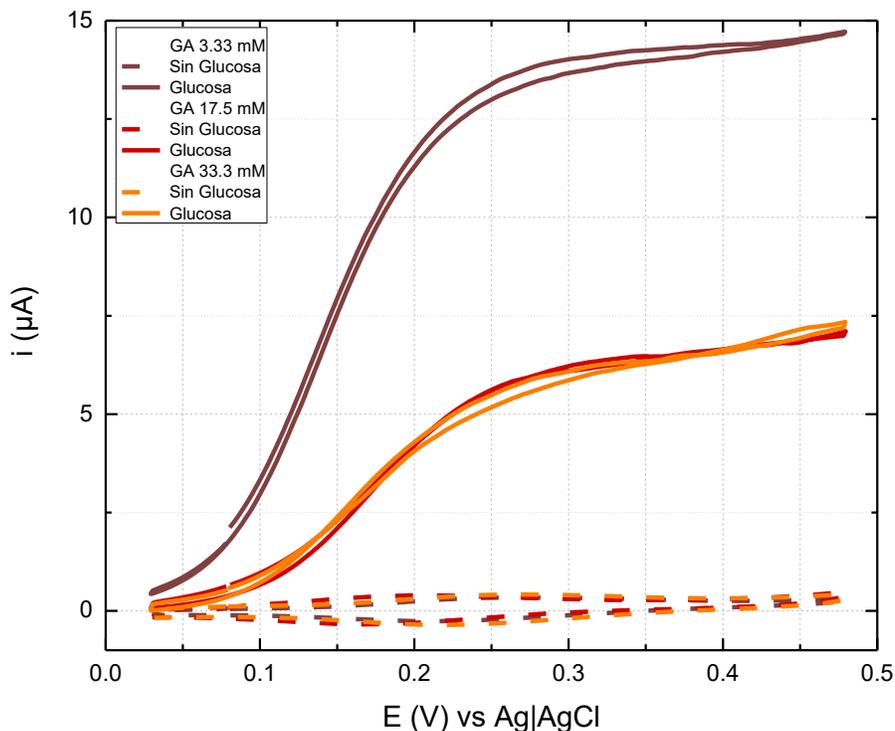


Figura 69. VC del sistema OsBPEI/GOx/GA con diferentes concentraciones de GA 3.33, 17.5 y 33.3 mM. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 2 mV/s.

En el sistema de OsBPEI/GOx/GA se evaluaron concentraciones de GA de 3.33, 17.5 y 33.3 mM. Inicialmente se corroboró el  $E_{pa}$  (Figura 69) de cada concentración en una solución de glucosa 100 mM en PB 0.1 M pH 7.4; los voltamperogramas se realizaron con una velocidad de barrido de 2 mV/s para observar adecuadamente la catálisis de la enzima. De acuerdo con las evaluaciones se utilizaron 0.35 V para llevar a cabo la curva de calibración por cronoamperometría. Se observaron mayores corrientes con menores concentraciones del entrecruzador (Figura 70). Sin embargo, presentan menor estabilidad al perder el 90.81 (3.33 mM) y 90.61 (16.5 mM) % de la señal tras la tercera evaluación, en comparación con el 75.71 % (33.3 mM) de la concentración más alta. Por esta razón se seleccionó la concentración de 33.3 mM para las evaluaciones posteriores.

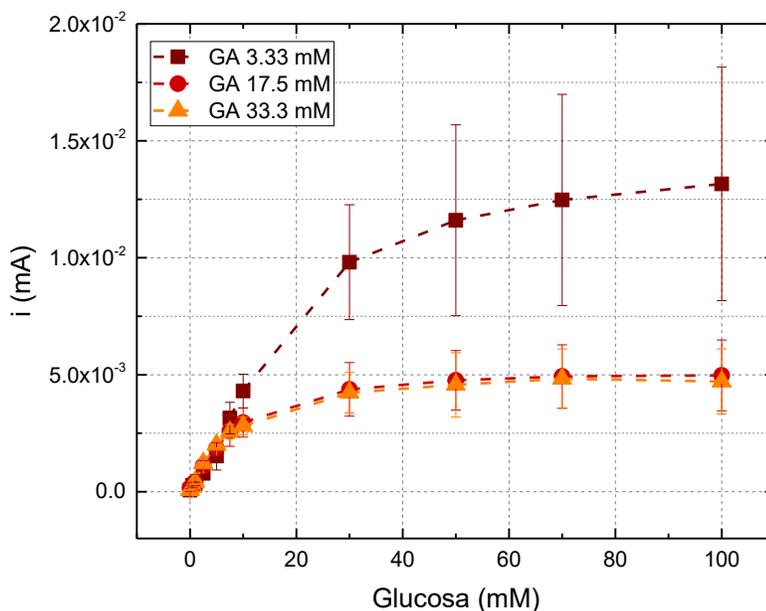


Figura 70. Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM) en el sistema OsBPEI/GOx/GA con concentraciones de GA 3.3, 16.5 y 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica.

En el sistema de OsBPEI/GOx/EGDGE se evaluaron concentraciones de EGDGE de 3.33, 17.5 y 33.3 mM. Inicialmente se corroboró el  $E_{pa}$  (Figura 71) de cada concentración, los voltamperogramas se realizaron en una solución de glucosa 100 mM en PB 0.1 M pH 7.4 con una velocidad de barrido de 2 mV/s para observar adecuadamente la catálisis de la enzima. De acuerdo con las evaluaciones se utilizaron 0.35 V para llevar a cabo la curva de calibración por cronoamperometría. Se observó una corriente mayor con la menor concentración del entrecruzador (Figura 72). Sin embargo, no se presenta una tendencia clara relacionada con la concentración del entrecruzador como en el sistema con GA. La concentración de 17.5 mM es la que presenta menores corrientes (Figura 73) en las evaluaciones. Por otra parte, el sistema presenta menor estabilidad en comparación con el sistema de GA. Anteriormente se ha reportado que los hidrogeles con EGDGE presentan menor estabilidad en comparación con GA, que es una molécula más pequeña en comparación con el EGDGE y crea hidrogeles más compactos. Esta característica se refleja en la estabilidad de las evaluaciones porque al formar redes más compactas hay menos probabilidades de pérdida enzimática<sup>90</sup>. En este sistema, tras la segunda evaluación las concentraciones de 17.5 y 3.33 mM perdieron el 97.23 y 97.79 % de la señal, respectivamente. En comparación, la concentración de 33.3 mM presentó una pérdida del 85.36 % de la señal. Por esta razón se seleccionó la concentración de 33.3 mM para las evaluaciones posteriores.

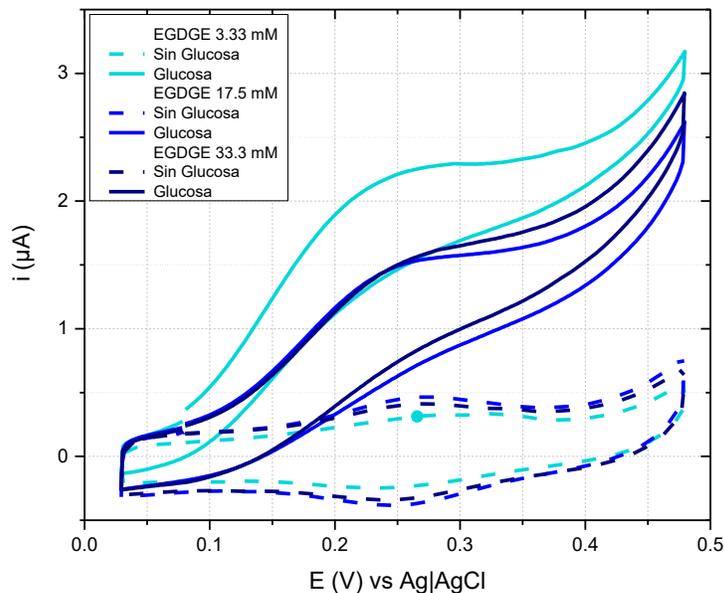


Figura 71. VC del sistema OsBPEI/GOx/EGDGE con diferentes concentraciones de EGDGE 3.33, 16.5 y 33.3 mM. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 2 mV/s.

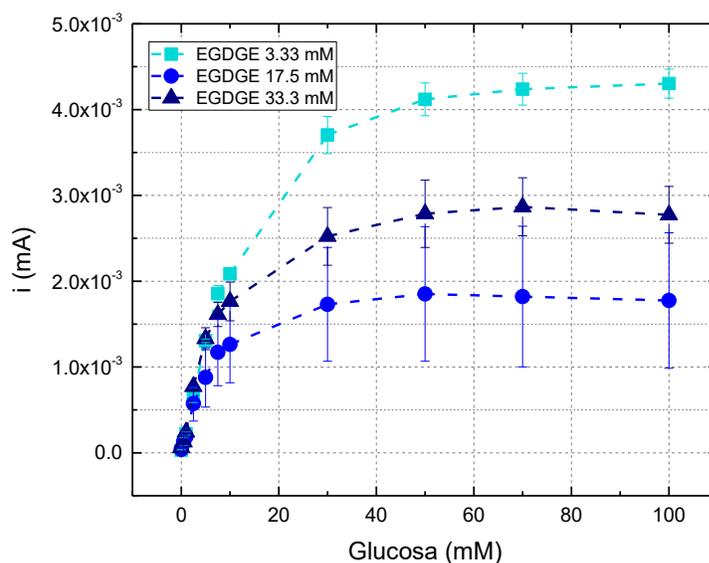


Figura 72. Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM) en el sistema OsBPEI/GOx/GA con concentraciones de GA 3.33, 16.5 y 33.3 mM. Evaluación cronoamperométrica.

Es fundamental conocer el funcionamiento del hidrogel en los medios de cultivo reportados para el crecimiento de las líneas celulares que se utilizarán. Se evaluó el comportamiento de los sistemas OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM y OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM en medio de cultivo celular RPMI 1640 con diferentes concentraciones de glucosa (0 - 100 mM) y sin suplementos adicionales. Se observaron

corrientes mayores con el sistema de EGDGE (Figura 73); sin embargo, ambos presentaron un comportamiento similar en las evaluaciones de estabilidad. Después de la quinta evaluación el sistema con GA (Figura 74) perdió el 90.5 % de la señal y el sistema con EGDGE (Figura 75) el 88.10 %.

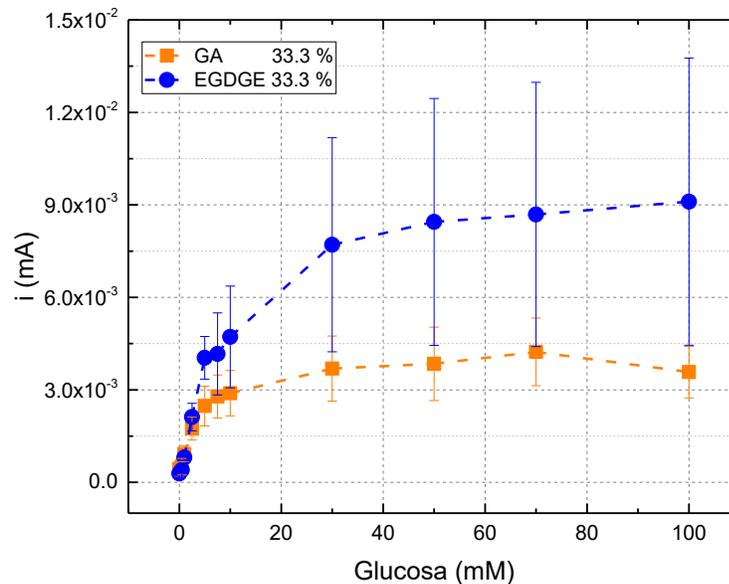


Figura 73. Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM) en medio RPMI 1640 con OsBPEI/GOx/GA y OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM. Evaluación CA de diferentes chips.

Finalmente, se realizaron evaluaciones en medio de cultivo RPMI 1640 con suero fetal bovino (SFB). El SFB es un suplemento de crecimiento para el cultivo de células y tejidos, usualmente se agrega entre 5 - 10 % en los diseños de cultivo celular para obtener buenos rendimientos. Se compone de los factores requeridos para el crecimiento, unión y proliferación de la mayoría de los tipos de células humanas y animales. Sin embargo, no ha sido completamente caracterizado. Los estudios actuales indican la presencia de aproximadamente 1,800 proteínas y más de 4,000 metabolitos en el suero<sup>94</sup>, factor que podría representar un problema con la estabilidad de los electrodos por la presencia de interferentes o bien, elementos que se adsorban en la superficie. Por este motivo es necesario evaluar si representará un problema en el sistema y de ser así, buscar alternativas para cubrir los requerimientos celulares.

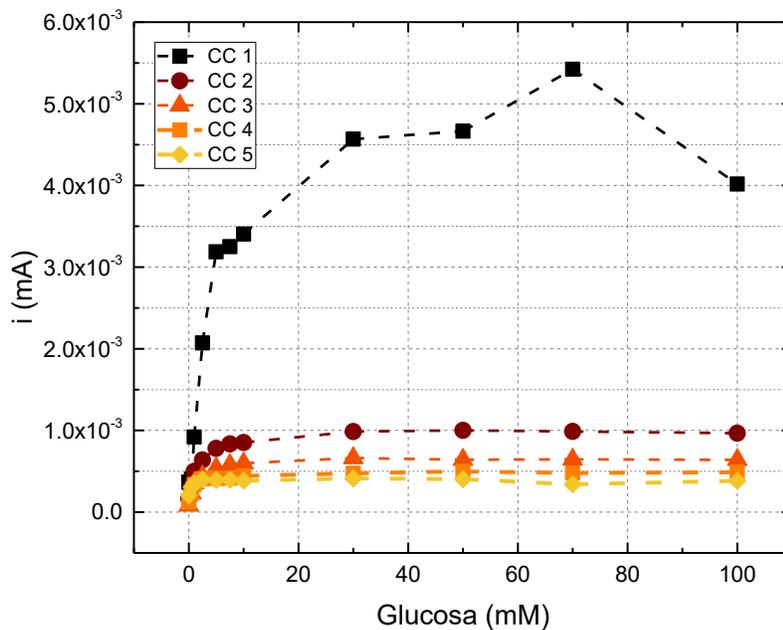


Figura 74. Curva de calibración (CC) de glucosa (0 - 100 mM) en medio de cultivo RPMI 1640 en el sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM. Evaluación CA en el mismo chip.

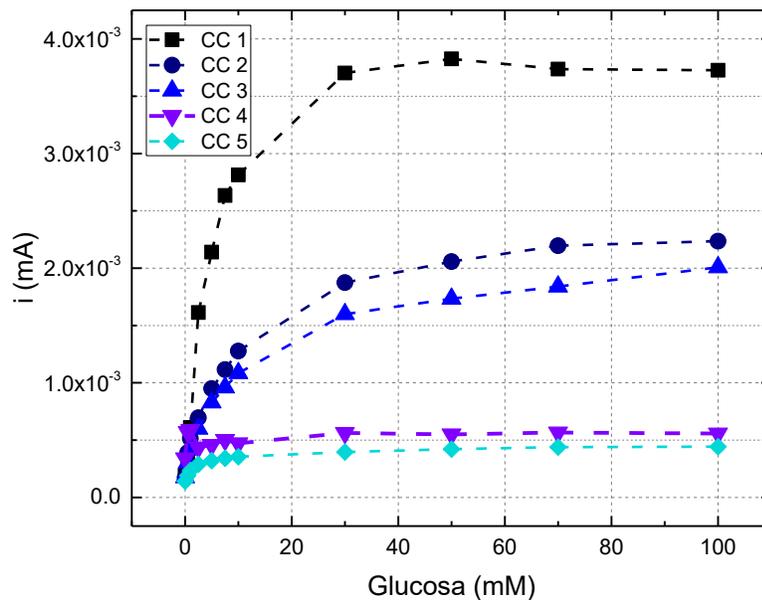


Figura 75. Curva de calibración (CC) de glucosa (0 - 100 mM) en medio RPMI 1640 en el sistema OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM. Evaluación CA en el mismo chip.

Las evaluaciones se realizaron en los sistemas OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM y OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM en medio RPMI 1640, glucosa 5 mM con concentraciones de 2.5 - 10 % de SFB. Adicionalmente, se consideraron dos controles, utilizando medio RPMI 1640 0 mM, 0 % SFB y medio

RPMI 1640 5 mM, 0 % SFB. En el análisis de resultados, se observan únicamente variaciones de corriente dentro del error estándar. No se observa una tendencia clara que indique un problema con el uso de concentraciones altas de SFB (Figura 76). Por lo tanto, es factible su uso para las evaluaciones posteriores.

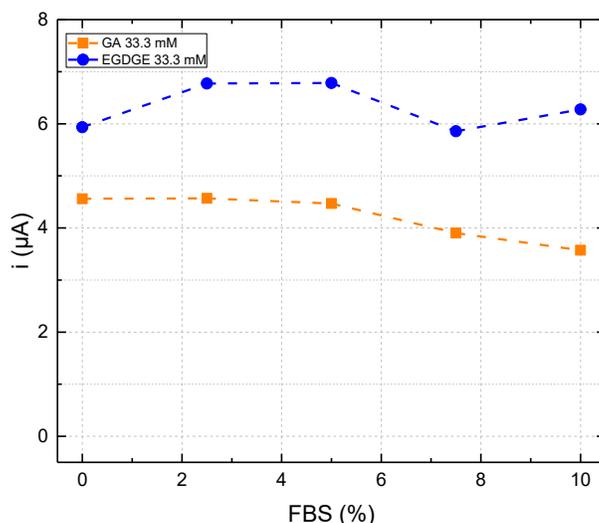


Figura 76. Evaluación del sistema OsBPEI/GOx/GA y OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM en medio de cultivo RPMI 1640 (glucosa 5 mM) con SFB entre 2.5 - 10 %. Evaluación cronoamperométrica.

Para realizar una comparación más profunda sobre la composición de los hidrogeles se concentra la información de los parámetros de rendimiento en la Tabla 5. El límite de detección y el límite de cuantificación representan la concentración más baja que puede ser detectada confiablemente y determinada cuantitativamente con exactitud y precisión, respectivamente. La sensibilidad se calculó a través de la ecuación de la recta, utilizando la pendiente en el rango lineal indicado. El rango lineal se consideró desde 0 hasta la concentración donde se obtiene una  $R^2$  igual o mayor a 0.98. Para evaluar la estabilidad del sistema, se realizaron tres curvas de calibración consecutivas en el mismo electrodo; el porcentaje restante de  $j_{max}$  tras la última evaluación se consideró como el porcentaje de estabilidad para cada composición.

De acuerdo con el análisis de datos (Tabla 5), en los hidrogeles con GA se observó la mayor  $j_{max}$  ( $208 \mu A/cm^2$ ) en la composición con la menor concentración (3.33 mM). Probablemente se debe a que un menor grado de entrecruzamiento en la estructura genera una estructura menos densa, cuestión que podría favorecer la difusión de glucosa. Por otro lado, la mayor concentración (33.3 mM) evaluada presentó la menor  $j_{max}$  ( $60.9 \mu A/cm^2$ ), sin embargo, presentó los mejores parámetros (Tabla 5),

menores valores de LOD (0.12 mM) y LOQ (0.39 mM), una mayor sensibilidad (4.64  $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$ ) y la mejor estabilidad entre las diferentes concentraciones (19.5 %). Por otro lado, en las evaluaciones con EGDGE se observaron corrientes más bajas en comparación con los resultados de GA. Los electrodos mostraron bajos porcentajes de estabilidad (1.33 – 7.23 %) y perdieron la mayor parte de su función tras la segunda evaluación.

Tabla 5. Comparación del LOD, LOQ, sensibilidad, estabilidad, rango lineal y  $R^2$  de diferentes composiciones del hidrogel.

Hidrogel	LOD (mM)	LOQ (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$ )	Estabilidad (% $j_{\text{max}}$ )	Rango lineal (mM)	$R^2$
<b>SPE en 0.1 M pH 7.4 PB</b>						
OsBPEI/GOx/GA 3.33 mM	0.48	1.59	3.36	7.59	0–5	0.997
OsBPEI/GOx/GA 17.5 mM	0.89	2.98	3.82	9.14	0–7.5	0.994
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	0.12	0.39	4.64	19.5	0–5	0.987
OsBPEI/GOx/EGDGE 3.33 mM	0.09	0.30	2.90	1.33 *	0–7.5	0.998
OsBPEI/GOx/EGDGE 17.5 mM	0.42	1.40	1.74	1.34 *	0–7.5	0.980
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	0.61	2.05	2.66	7.23 *	0–5	0.993
BPEI/GOx/GA 33.3 mM	3.05	10.2	2.96	100	0.5–5	0.994
BPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	36.38	121.28	4.64	53.6	0.5–7.5	0.911
<b>SPE en RPMI-1640</b>						
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	1.41	4.71	5.22	12.2	0–5	0.970
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	0.28	0.93	9.04	50.7	0–5	0.995

Por otro lado, los biosensores enzimáticos son caracterizados en términos de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y los valores de la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ). Sin embargo, los biosensores enzimáticos electroquímicos al relacionar la corriente con la concentración se evalúan en términos de  $K_m^{\text{app}}$  y corriente máxima ( $i_{\text{max}}$ ) para determinar los rendimientos. Para llevar a cabo el análisis de datos, se utilizaron los valores obtenidos de las curvas de calibración para calcular los parámetros a través de un ajuste no lineal con la función de hipérbola que simula el modelo de Michaelis-Menten para la cinética enzimática. Cabe mencionar que se restaron los valores del blanco en cada set de datos (excepto en los datos de los biosensores de primera generación). Para facilitar la comparación de los

datos, se reportan los valores en función de la densidad de corriente ( $j_{\max}$ ). Por su parte,  $K_m$  ( $K_m^{\text{app}}$ ) nos brinda información sobre la afinidad de la enzima con el sustrato, donde una disminución en el valor de  $K_m$  representa una mayor afinidad. Los valores reportados para la enzima libre son de 26 mM<sup>95</sup>. En la Tabla 6 se resumen los valores que describen la actividad enzimática de acuerdo con cada uno de los sistemas analizados. En las evaluaciones realizadas en PB 0.1 M pH 7.4 con EGDGE se obtuvieron valores entre 6.31 – 14.0 mM, mientras que en GA se obtuvieron valores entre 8.76 – 31.8 mM. Sin embargo, en los hidrogeles la diferencia en el valor de  $K_m^{\text{app}}$  puede originarse por el coeficiente de partición, debido a la preconcentración del sustrato en el hidrogel. Por otra parte, en las evaluaciones con medio de cultivo los valores de  $K_m^{\text{app}}$  y  $j_{\max}$  aumentaron, y se observó un mejor rendimiento del biosensor.

Tabla 6. Comparación de  $K_m^{\text{app}}$  y la  $j_{\max}$  de hidrogeles con diferente composición. Los datos fueron obtenidos de 3 electrodos independientes.

	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$n^{\text{app}}$ (mV)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	
							Promedio		
SPEs en 0.1 M pH 7.4 PB									
OsBPEI/GOx/GA 3.33 mM	19.9	110	43.1	298	30.1	230	31.8±5.32	208±13.8	0.987
OsBPEI/GOx/GA 17.5 mM	6.16	58.4	10.6	45.1	14.4	89.0	10.1±0.75	63.5±1.27	0.995
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	4.68	39.4	11.4	75.3	10.0	69.5	8.76±0.55	60.9±1.04	0.996
OsBPEI/GOx/EGDGE 3.33 mM	14.0	60.9	13.1	55.5	14.8	60.6	14.0±1.20	58.9±1.50	0.994
OsBPEI/GOx/EGDGE 17.5 mM	5.53	17.2	5.53	16.2	7.20	35.2	6.31±0.63	22.7±0.58	0.990
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	14.0	41.6	8.26	38.7	7.22	32.4	10.9±0.94	25.4±0.69	0.993
BPEI/GOx/GA 33.3 mM	5.61	37.5	6.30	80.3	5.55	63.5	5.89±0.75	60.4±1.85	0.982
BPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	32.9	190	22.3	143.9	22.2	140	28.4±7.49	158±15.0	0.968
SPEs en RPMI-1640									
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	4.00	31.0	4.49	54.0	5.51	43.9	4.68±0.73	43.0±1.62	0.976
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	3.59	44.3	13.5	161	12.7	151	10.6±0.99	113±3.01	0.992

Adicionalmente, se reportan los datos de las evaluaciones realizadas en un mismo chip

consecutivamente para evaluar la estabilidad del sistema (Tabla 7). En general se observa una disminución en los valores de  $K_m^{app}$  y  $j_{max}$  tras cada evaluación, en donde  $j_{max}$  nos indica la disminución del rendimiento del biosensor debido a la estabilidad del sistema.

Tabla 7. Comparación de  $K_m^{app}$  y la  $j_{max}$  de hidrogeles con diferente composición. Los datos fueron obtenidos de 3 evaluaciones consecutivas en un mismo electrodo.

	$K_m^{app}$ (mM)	$j_{max}$ ( $\mu A/cm^2$ )	$K_m^{app}$ (mM)	$j_{max}$ ( $\mu A/cm^2$ )	$K_m^{app}$ (mM)	$j_{max}$ ( $\mu A/cm^2$ )
SPEs en 0.1 M pH 7.4 PB						
OsBPEI/GOx/GA 3.33 mM	19.9	110	12.0	24.5	7.14	8.35
OsBPEI/GOx/GA 17.5 mM	6.16	58.3	3.50	19.6	4.38	5.33
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	2.34	22.0	1.99	10.5	2.23	4.29
OsBPEI/GOx/EGDGE 3.33 mM	14.0	60.9	5.01	0.81	-	-
OsBPEI/GOx/EGDGE 17.5 mM	5.53	17.1	3.30	0.23	-	-
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	14.0	41.6	20.8	3.01	-	-
BPEI/GOx/GA 33.3 mM	5.61	37.4	3.33	48.6	4.62	52.3
BPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	32.9	190	16.4	187	11.5	102
SPEs en RPMI-1640						
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	4.49	54.0	1.89	9.74	1.31	6.61
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	3.59	44.3	9.48	26.2	10.4	22.5

Por otra parte, para ambos entrecruzadores se determinó el régimen de transporte de masa. De acuerdo con el rango utilizado con la velocidad de barrido ( $v$ ) se observó que la corriente es linealmente dependiente de  $v$ . Por lo tanto, el sistema se encuentra en un régimen de capa delgada (Figura 77) al utilizar EGDGE o GA.

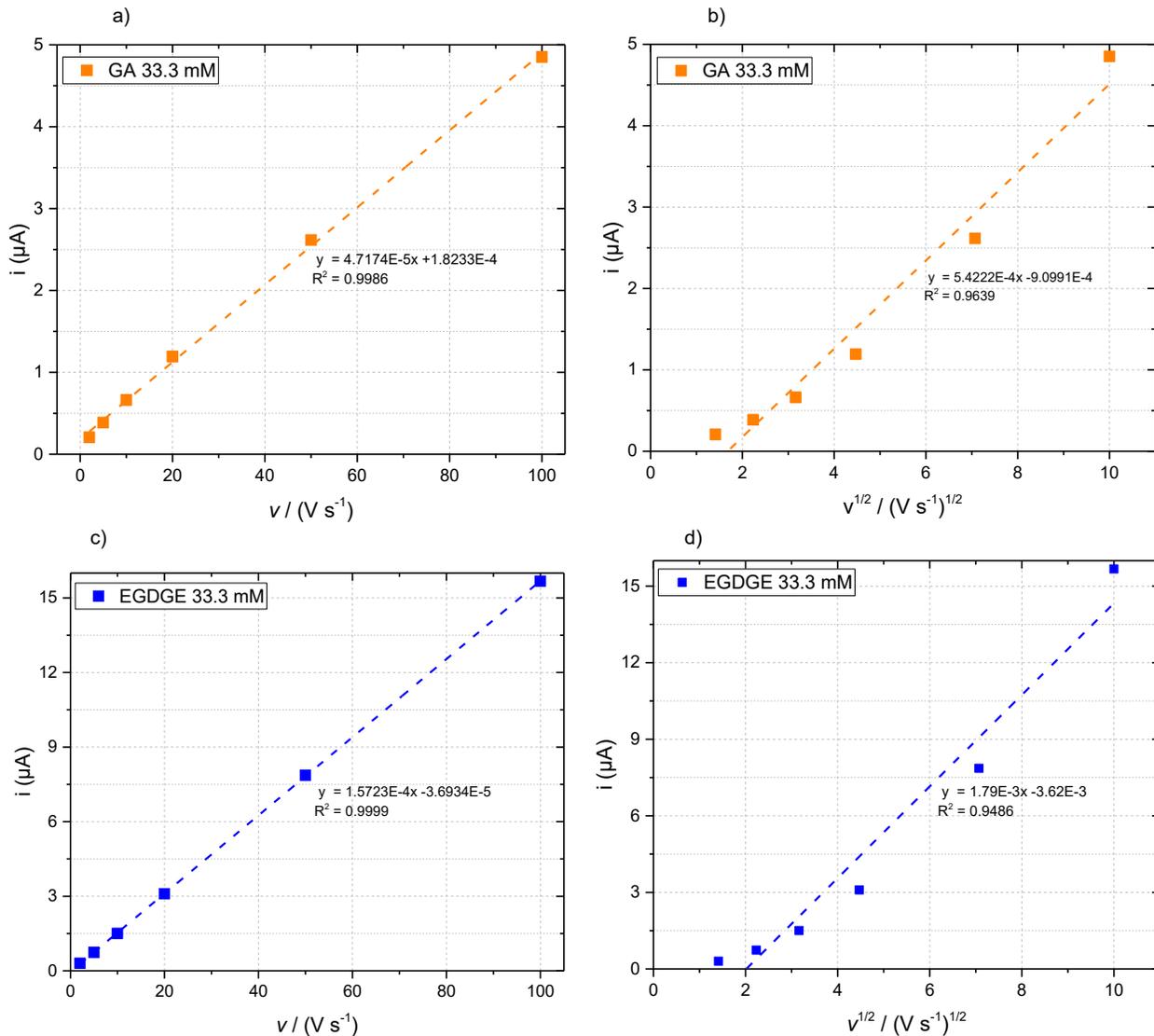


Figura 77. Dependencia de la corriente en SPEs modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE con respecto a A, C) la velocidad de barrido o B, D) la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en PB 0.1 M, pH 7.4, en ausencia de glucosa.

### 3.5.2.3 Evaluación de interferentes en biosensores enzimáticos de segunda generación en electrodos serigrafados de carbono

Adicionalmente, se ha identificado que los biosensores son susceptibles a los interferentes presentes en diferentes medios de evaluación. Esta cuestión es especialmente problemática en muestras biológicas, que pueden contener interferentes electroactivos, proteínas, macromoléculas y

compuestos del metabolismo celular. Dichos interferentes pueden adsorberse/absorberse en la superficie del biosensor, inhibiendo la electrocatálisis, impidiendo la difusión del analito y provocando un decremento significativo en la respuesta, o bien, acortando el tiempo de uso del biosensor. Se conoce que algunas condiciones patológicas, como los tumores o procesos inflamatorios, pueden modificar la composición química y los parámetros del medio, cuestiones que pueden modificar la actividad enzimática y en consecuencia el rendimiento del biosensor<sup>88</sup>. Por lo tanto, se realizó la evaluación de los interferentes más comunes en la detección de glucosa: ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA) y ácido láctico (AL), considerando que los niveles normales en muestras biológicas de cada interferente son los siguientes:

- Ácido láctico: menores a 2 mM<sup>96</sup>.
- Ácido úrico: en hombres entre 0.24 – 0.51 mM y en mujeres entre 0.16 – 0.43 mM<sup>97</sup>.
- Ácido ascórbico: 0.028 mM<sup>98</sup>.

Se evaluó el comportamiento del biosensor con electrodos serigrafados de carbono (SPE) independientes (evaluaciones realizadas por triplicado) para cada uno de los interferentes (AU, AA y AL) en un rango de 0 – 5 mM en una solución de PB 0.1 M pH 7.4 con glucosa 5 mM (Figuras 78a y 82a). Adicionalmente se realizó una evaluación independiente de los interferentes en un rango de 0 – 10 mM en PB 0.1 M pH 7.4 sin glucosa (Figuras 78b y 82b).

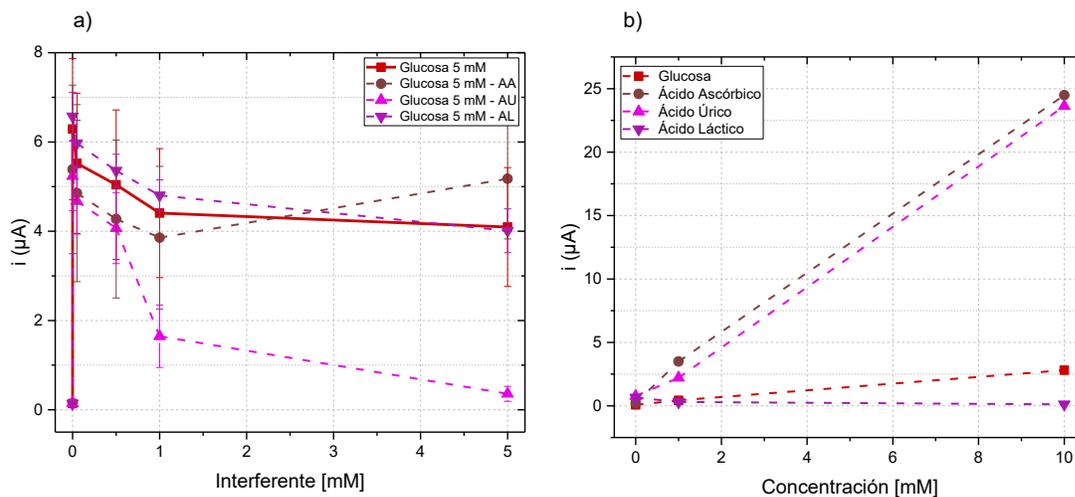


Figura 78. Evaluación de los interferentes: AA, AU y AL en SPE modificados con OsBPtE/GOx/GA en PB 0.1 M pH 7.4 A) con glucosa 5 mM y B) sin glucosa. Adicionalmente se evaluó una solución 5 mM de glucosa como control.

Se realizaron las evaluaciones con los interferentes en los hidrogeles con EGDGE/GA y se consideró

como control la evaluación consecutiva de 5 muestras de una solución 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4. En las evaluaciones de glucosa 5 mM en el SPE modificado con OsBPEI/GOx/GA (Figura 78a) se observó un descenso continuo en la corriente tras cada evaluación, con un remanente del 64.1 % tras la quinta evaluación. En las evaluaciones con AL con glucosa 5 mM, se observó un comportamiento similar a los experimentos con glucosa 5 mM, sin presentar un desplazamiento de potencial en el pico de oxidación (Figura 79a) y con un remanente de la señal del 60.9 % tras la quinta evaluación. Con el AA (en glucosa 5 mM), se observa la pérdida de corriente hasta la concentración 1 mM, sin embargo, a partir de 5 mM se observa un incremento en la corriente y el desplazamiento del potencial de oxidación, de 0.08 a 0.2 V (Figura 80a), indicando problemas en la detección de glucosa a partir de concentraciones mayores a 1 mM y con un remanente de la señal del 70.5 % tras la cuarta evaluación. Sin embargo, como se mencionaba anteriormente, los valores encontrados en muestras biológicas son de 0.028 mM y no representa un problema en nuestro sistema. Finalmente, con AU (en glucosa 5 mM), se observa una mayor pérdida en la corriente. El potencial de oxidación se desplaza de 0.12 a 0.18 y 0.24 V (Figura 81a), con las concentraciones 1 y 5 mM, respectivamente, provocando la disminución en la señal de oxidación. Por lo tanto, concentraciones mayores a 0.5 mM representarían un problema en el sistema.

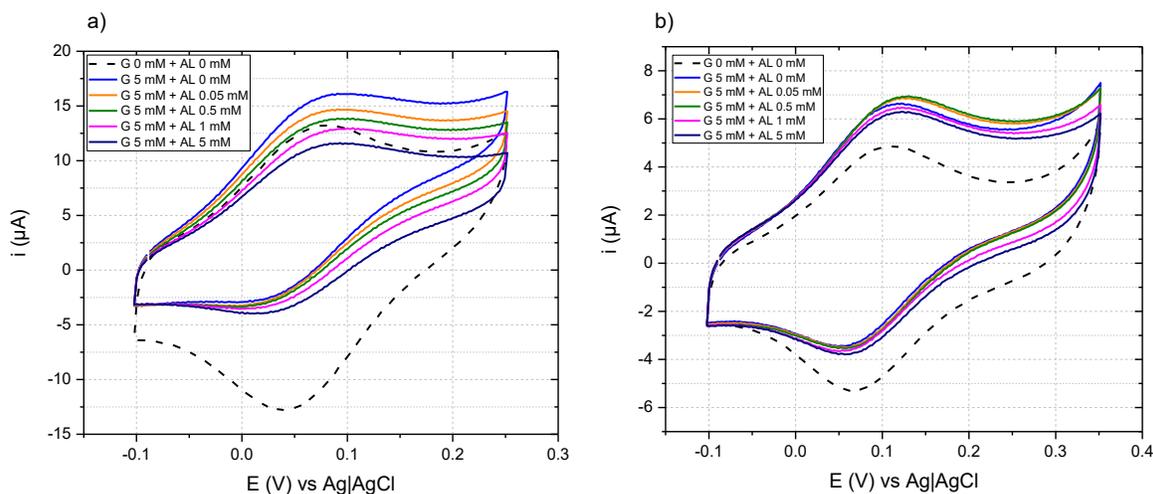


Figura 79. Voltamperogramas cíclicos de SPE modificados con a) OsBPEI/GOx/GA o b) OsBPEI/GOx/EGDGE en una solución 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4 con concentraciones entre 0 – 5 mM de AL.

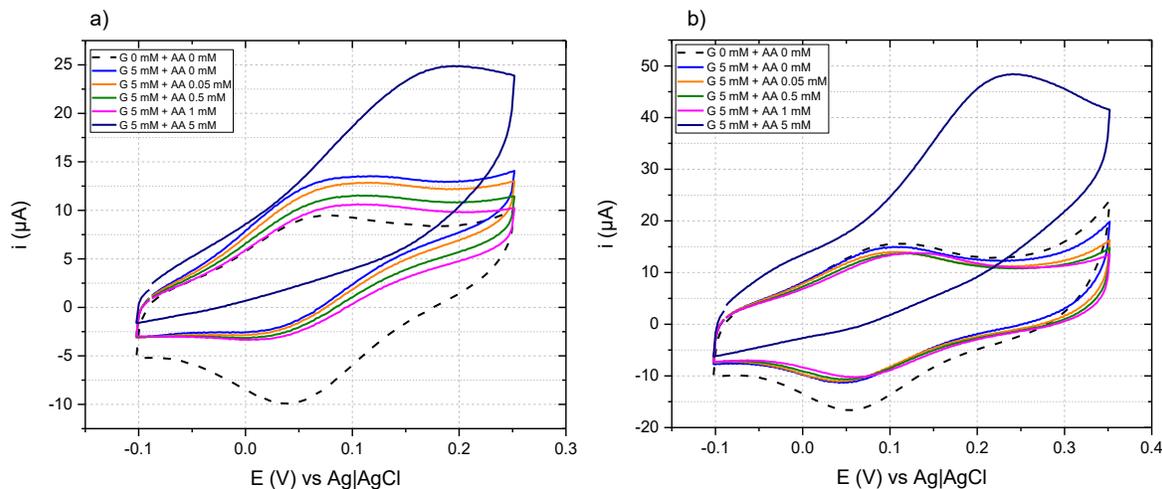


Figura 80. Voltamperogramas cíclicos de SPE modificados con A) OsBPEI/GOx/GA o B) OsBPEI/GOx/EGDGE en una solución 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4 con concentraciones entre 0 – 5 mM de AA.

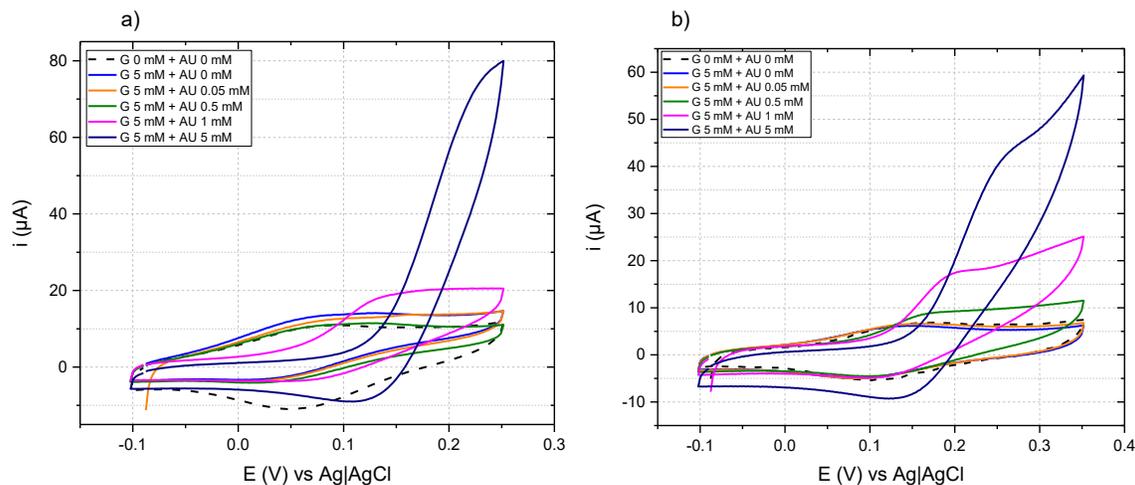


Figura 81. Voltamperogramas cíclicos de SPE modificados con A) OsBPEI/GOx/GA o B) OsBPEI/GOx/EGDGE en una solución 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4 con concentraciones entre 0 – 5 mM de AU.

Con OsBPEI/GOx/EGDGE (Figura 82a) en las evaluaciones con glucosa 5 mM en PB 0.1 M pH 7.4 se observó un descenso continuo en la corriente tras cada evaluación, con un remanente del 73.1 % tras la quinta evaluación. Siendo más estable que OsBPEI/GOx/GA. En las evaluaciones con AL con

glucosa 5 mM, se observó un comportamiento similar a los experimentos con glucosa 5 mM, sin embargo, una vez que se agregó el interferente presentó un desplazamiento de potencial en el pico de oxidación de 0.10 a 0.12 V (Figura 79b). Se obtuvo un remanente de la señal del 70.8 % tras la quinta evaluación. Con el AA en glucosa 5 mM, al igual que con GA, se observa la pérdida de corriente hasta la concentración 1 mM, a partir de 5 mM se observa un incremento en la corriente y el desplazamiento del potencial de oxidación, de 0.1 a 0.225 V (Figura 80b), indicando problemas en la detección de glucosa a partir de concentraciones mayores a 1 mM y con un remanente de la señal del 72.5 % tras la cuarta evaluación. Con AU en glucosa 5 mM, se observa una menor pérdida en la corriente en comparación con el sistema de GA. El potencial de oxidación se desplaza de 0.15 a 0.2 y 0.27 V (Figura 81b), con las concentraciones 1 y 5 mM, respectivamente, provocando la disminución en la señal de oxidación. Por lo tanto, concentraciones mayores a 0.5 mM representarían un problema en el sistema de detección.

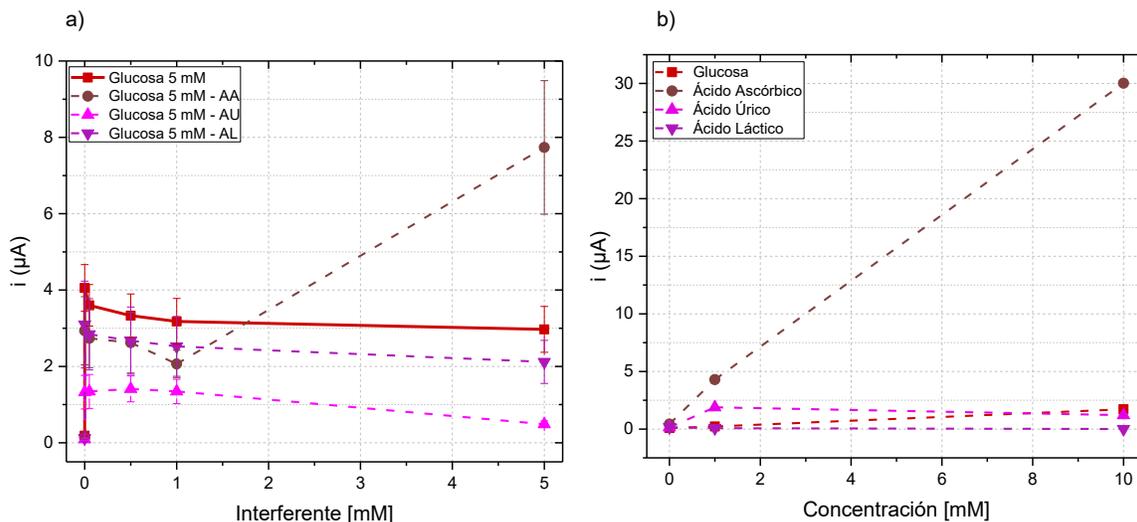


Figura 82. Evaluación de los interferentes: ácido ascórbico, ácido úrico y ácido láctico en SPE modificados con OsBPEI/GOx/EGDGE en PB 0.1 M pH 7.4 A) con glucosa 5 mM y B) sin glucosa. Solución 5 mM de glucosa como control en cada evaluación.

Adicionalmente, para comprender el comportamiento de cada interferente, se realizó la evaluación de cada uno sobre un SPE sin modificación en PB 0.1 M pH 7.4. Se llevó a cabo la evaluación de concentraciones entre 0 – 10 mM de cada uno de los interferentes (Figura 83). En las evaluaciones por VC se empleó una ventana de potencial de -0.9 a 0.35 V de acuerdo con las características de nuestro mediador (Figura 84a). Se observa el inicio de la oxidación en un potencial de 0.2 y 0.1 V para AU y AA respectivamente, y ningún cambio en el caso de AL (Figura 84a), confirmando de acuerdo con la literatura, que el AA y el AU, son especies electroactivas que pueden ser oxidadas directamente

en la superficie del electrodo<sup>99-102</sup>. Por otra parte, en las evaluaciones cronoamperométricas se utilizó un potencial de 0.14 V. Se observó un incremento en la corriente únicamente con ácido ascórbico, debido al potencial seleccionado (Figura 83). En cambio, cuando las mismas evaluaciones fueron realizadas en los SPE modificados con OsBPEI/GOx/GA o OsBPEI/GOx/EGDGE, se observó el desplazamiento del potencial de oxidación del mediador a potenciales más negativos en el caso de AL (Figura 84b) y más positivos con AA y AU (Figura 84c-d). Nuevamente, se observó un incremento en la corriente únicamente con AA y AU en la ventana de potencial seleccionada.

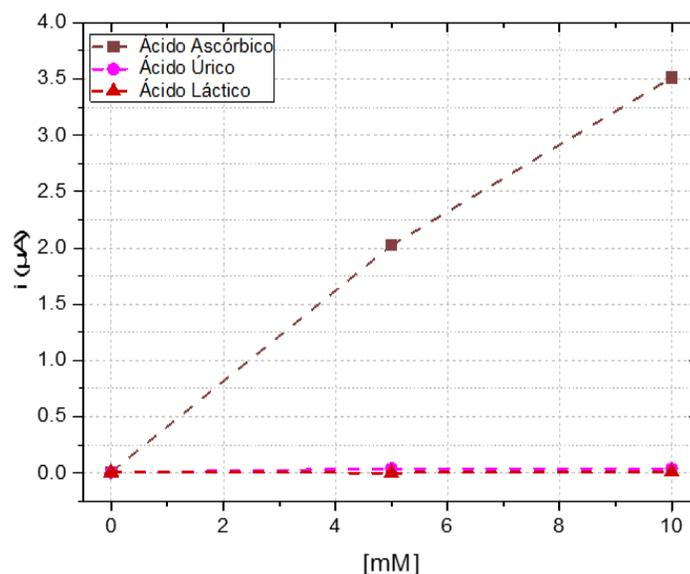


Figura 83. Evaluación de los interferentes: ácido ascórbico, ácido úrico y ácido láctico en PB 0.1 M pH 7.4 sin glucosa, sobre SPE sin modificación.

De acuerdo con los resultados, las características del biosensor indican que la presencia de los interferentes mencionados no provocará problemas en la detección de glucosa. En muestras reales, las concentraciones reportadas de AA son hasta 4 veces menores en comparación con las concentraciones que generan problemas en el biosensor ( $> 0.1$  mM). En la ventana de potencial seleccionada de acuerdo con las características del mediador, no se observa la oxidación del AL y no representaría un problema en el sistema. En el caso de AU, las concentraciones máximas reportadas en muestras reales son hasta 0.51 mM, encontrándose en el límite del biosensor ( $> 0.5$  mM). Por lo tanto, es posible realizar evaluaciones en muestras complejas.

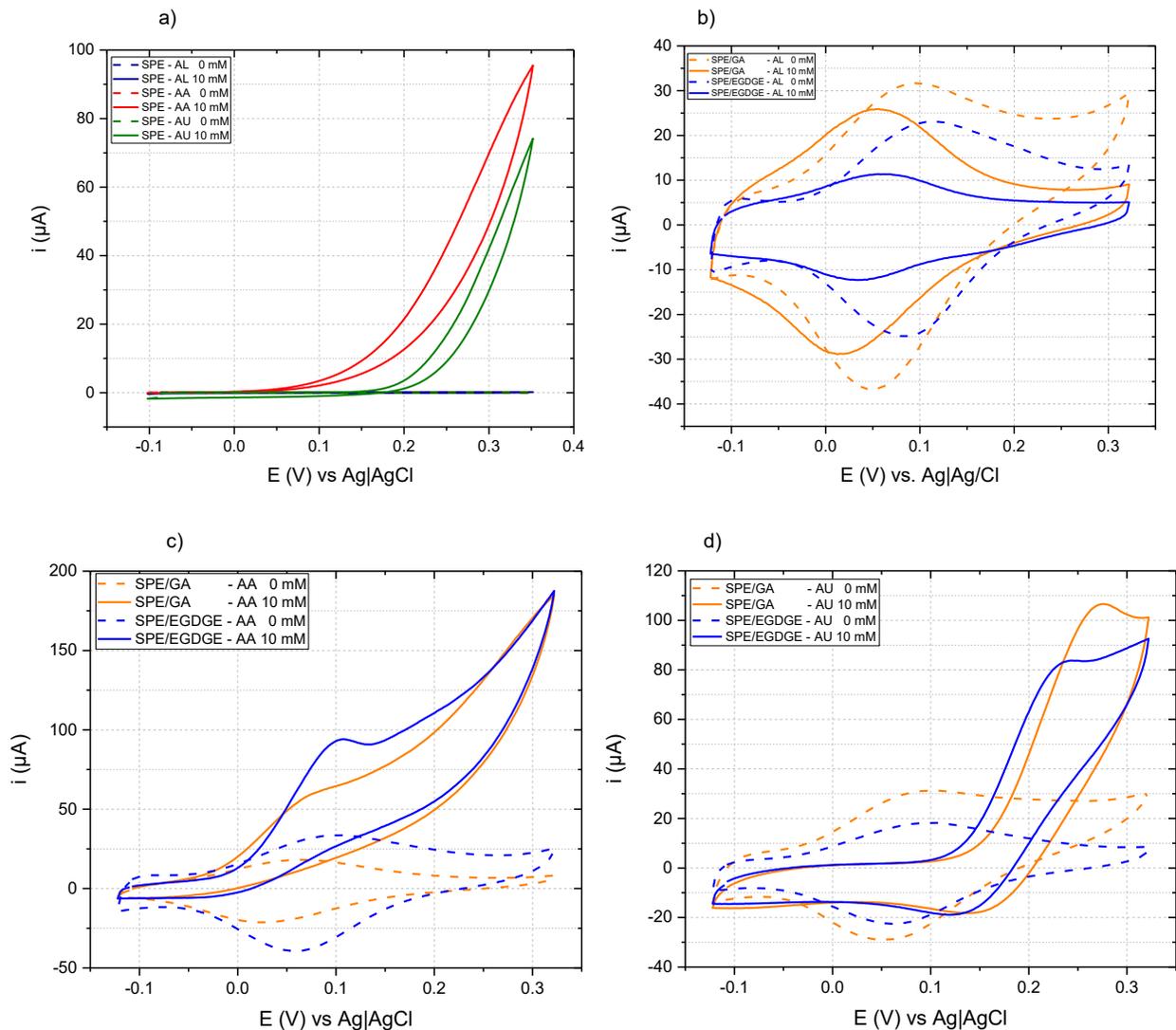


Figura 84. Voltamperogramas cíclicos de AL, AA y AU en PB 0.1 M pH 7.4 en A) SPE y B – D) SPE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. B) Evaluación de AL, C) Evaluación de AA y D) Evaluación de AU.

### 3.5.3 Evaluación de biosensores enzimáticos de segunda generación en puntillas de carbono.

En el diseño de biosensores, el uso de electrodos de carbono es muy común debido a su buena conductividad y bajos costos <sup>103</sup>. Entre ellos, las puntillas de carbono (pencil graphite electrodes-PGE) son populares para el análisis de una gran variedad de compuestos en matrices simples y complejas

por su bajo costo, facilidad para modificarlas, estabilidad, sensibilidad, reproducibilidad y por la variedad de dimensiones en las que se pueden encontrar<sup>104-107</sup>. Dichas características han facilitado su incorporación en canales microfluídicos para la evaluación de diferentes muestras<sup>106,108,109</sup>. Por lo tanto, se optó por evaluar el uso de puntillas de carbono debido a la simplicidad para acoplarlas en el chip microfluídico para cultivo celular.

Inicialmente se seleccionaron 5 marcas de puntillas de carbono con un diámetro de 0.5 mm para las evaluaciones: Foray, HB Azul, HB Negro, Teeny Tino y Staedtler (Figura 85).



Figura 85. Marcas de puntillas de carbono utilizadas como electrodos de trabajo.

Después del procedimiento de limpieza, se depositaron 3  $\mu$ l del hidrogel OsBPEI/GOx/GA en cada puntilla, donde se evaluaron soluciones de glucosa entre 0 - 100 mM en PB 0.1 M pH 7.4 por voltamperometría cíclica (VC) y cronoamperometría (CA). Posteriormente, para analizar su capacidad se evaluaron las siguientes soluciones:

- Glucosa 0 - 100 mM en PB 0.1 M pH 7.4.
- Glucosa 0, 5 y 30 mM en medio de cultivo RPMI 1640.
- Glucosa 0, 5 y 30 mM en medio de cultivo DMEM.
- Glucosa 0 - 100 mM en PB 0.1 M pH 7.4.

Se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración en el mismo electrodo, donde se tomó la corriente de cada cronoamperograma en  $t = 120$  s para reportar los valores de cada experimento.

Inicialmente con la puntilla de carbono de la marca Foray se determinó el potencial de oxidación de 0.15 V con una solución de glucosa 100 mM (Figura 86a) y se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración en PB y las evaluaciones en los medios de cultivo DMEM y RPMI 1640 en el mismo electrodo (Figura 86b). Se observó la pérdida de un 59.4 % en la señal después de la última evaluación. Sin embargo, el sistema es capaz de evaluar la concentración de glucosa directamente en medios de cultivo. El voltamperograma no muestra la tendencia sigmoïdal característica, sin embargo, es evidente el aumento de corriente con la solución de glucosa 100 mM.

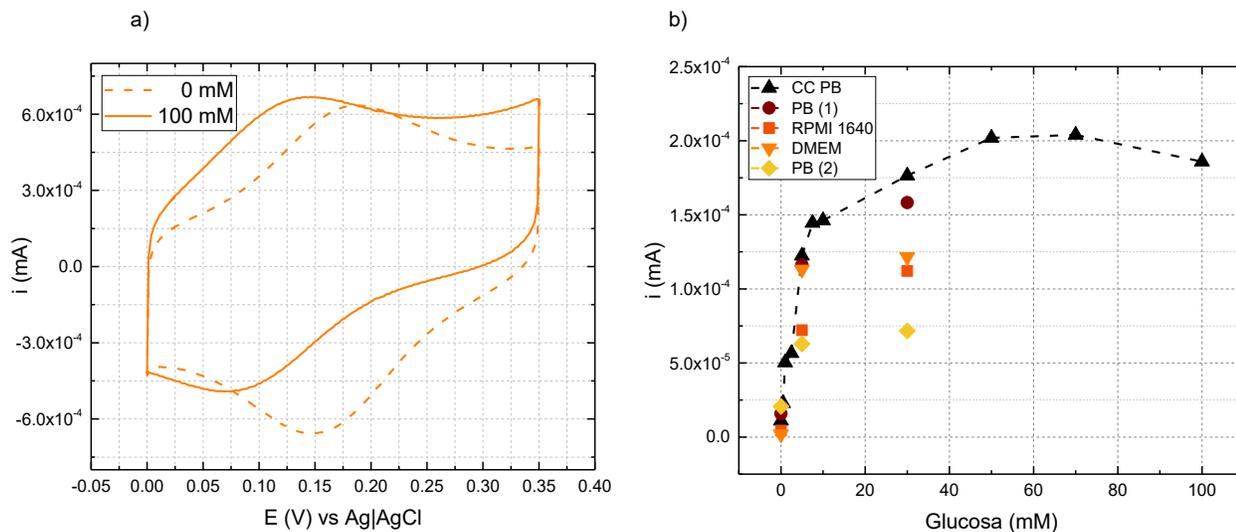


Figura 86. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os en puntilla Foray. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. b) Curvas de calibración (CC) de glucosa (0 - 100 mM). Evaluación cronoamperométrica en puntilla Foray.

Con la puntilla de carbono HB Azul se determinó el potencial de oxidación de 0.20 V con una solución de glucosa 100 mM (Figura 87a) y se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración y las evaluaciones en los medios de cultivo en el mismo electrodo (Figura 87b). Se observó la pérdida de un 62.8 % en la señal después de la última evaluación. Sin embargo, también es capaz de evaluar la concentración de glucosa directamente en medios de cultivo. Por otra parte, en el voltamperograma es evidente que no hay un aumento de corriente con el incremento en la concentración de glucosa y adicionalmente, no se observa la tendencia sigmoïdal característica de los procesos enzimáticos catalíticos. No obstante, en las evaluaciones cronoamperométricas se observa un incremento de corriente proporcional al incremento en la concentración de glucosa. Por lo tanto, es posible que la velocidad de barrido utilizada en los experimentos no sea adecuada para observar el ciclo catalítico de la enzima<sup>67</sup>.

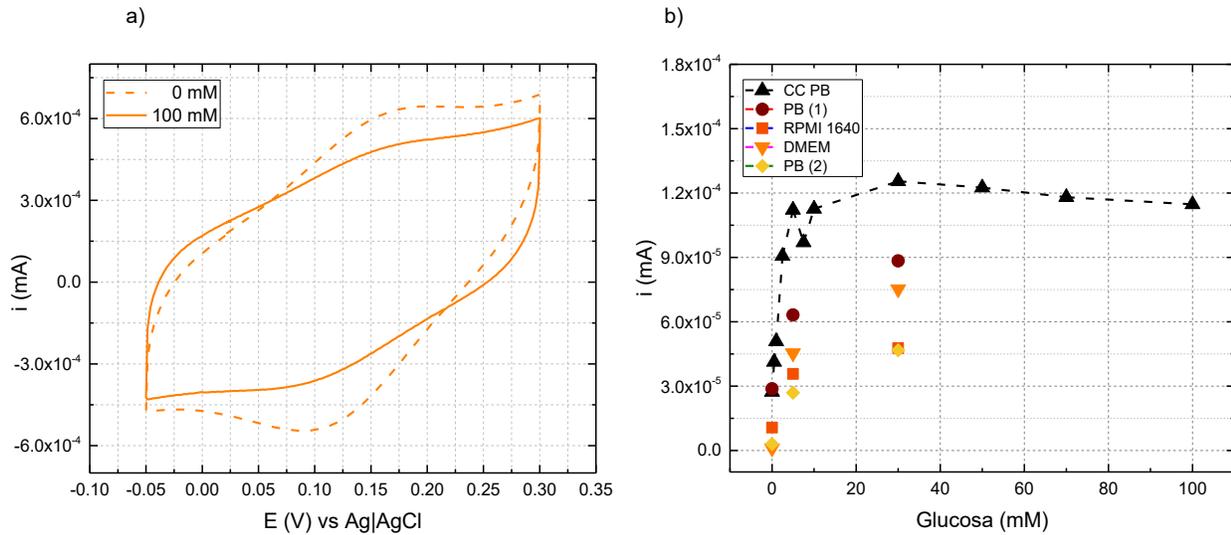


Figura 87. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBP/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os en puntilla HB azul. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. b) Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM). Evaluación cronoamperométrica en puntilla HB azul.

Con la puntilla de carbono HB Negro se determinó el potencial de oxidación de 0.15 V con una solución de glucosa 100 mM (Figura 88a), se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración (Figura 88b). Sin embargo, con este electrodo no fue posible realizar las evaluaciones con glucosa, no se obtuvo un aumento de corriente proporcional al aumento en la concentración de glucosa y por lo tanto fue descartado para las siguientes evaluaciones.

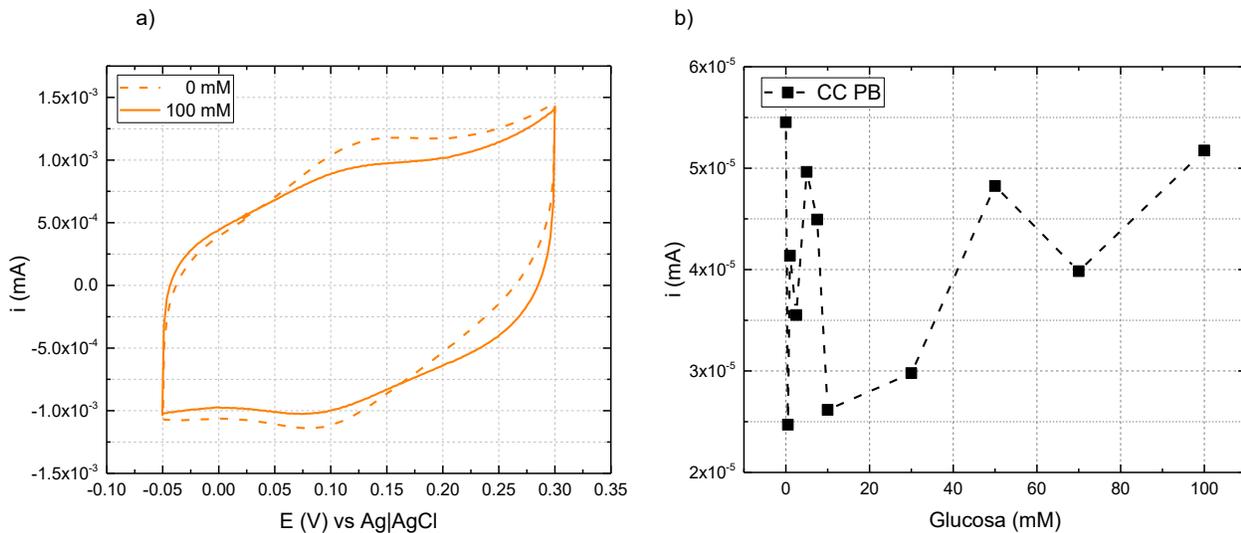


Figura 88. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBP/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os en puntilla HB negro. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. b) Curva de calibración (CC) de glucosa (0-100 mM). Evaluación cronoamperométrica en puntilla HB negro.

Con la puntilla de carbono de la marca Teeny Tino se determinó el potencial de oxidación de 0.18 V con una solución de glucosa 100 mM (Figura 89a), se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración y las evaluaciones en los medios de cultivo en el mismo electrodo (Figura 89b). Se observó la pérdida de un 61.6 % en la señal después de la última evaluación. Sin embargo, también es capaz de evaluar la concentración de glucosa directamente en medios de cultivo. Por otra parte, en el voltamperograma es evidente que no hay un aumento de corriente con el incremento en la concentración de glucosa como se observó en el caso de la puntilla HB Azul, es necesario disminuir la velocidad de barrido.

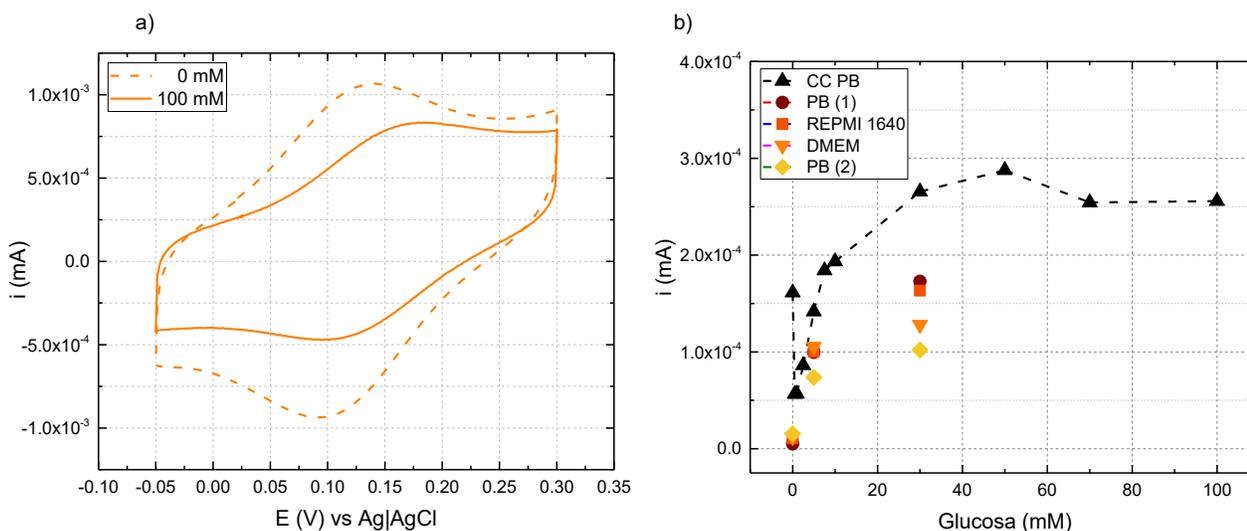


Figura 89. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os en puntilla Teeny Tino. Electrolito soporte: PB 0.1 M pH 7.4, 100 mV/s. b) Curva de calibración de glucosa (0 - 100 mM). Evaluación cronoamperométrica en Teeny Tino.

Con la puntilla de carbono de la marca Staedtler se determinó el potencial de oxidación de 0.20 V con una solución de glucosa 100 mM (Figura 90a), se realizaron las evaluaciones cronoamperométricas para llevar a cabo la curva de calibración y las evaluaciones en los medios de cultivo (Figura 90b). Se observó la pérdida de un 71.6 % en la señal después de la última evaluación. No obstante, el sistema es capaz de evaluar la concentración de glucosa directamente en medios de cultivo. El voltamperograma no muestra la tendencia sigmoideal característica, sin embargo, es evidente el aumento de corriente con la solución de glucosa 100 mM. Por otra parte, en comparación con los otros electrodos es el que presenta las corrientes más altas ( $2.3 \times 10^{-4}$  mA en 10 mM) y una  $R^2$  de 0.91 (10 mM). El electrodo que más se asemeja es la puntilla Foray con corrientes de  $1.5 \times 10^{-4}$  mA en 10 mM y  $R^2$  de 0.91.

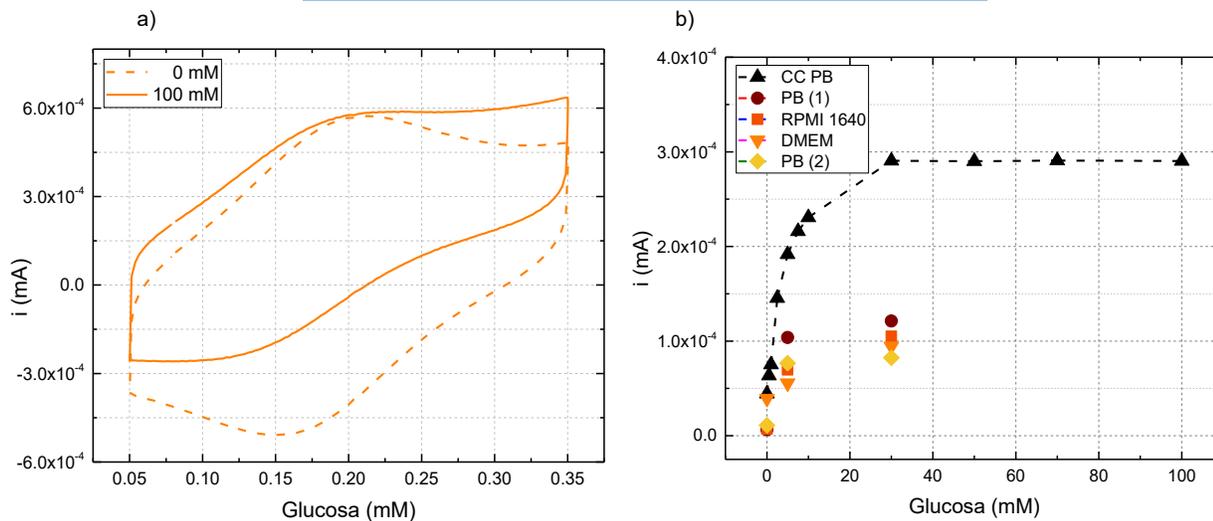


Figura 90. a) Voltamperograma cíclico del sistema OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM para determinar el  $E_{pa}$  del Os en puntilla Staedtler. Electrolito soporte: PB 0.1 M, pH 7.4, 100 mV/s. b) Curva de calibración (CC) de glucosa (0 - 100 mM). Evaluación cronoamperométrica en Staedtler.

De acuerdo con los resultados se seleccionó la puntilla de carbono Foray para realizar las evaluaciones dentro del chip microfluídico. Presentó el menor potencial de oxidación para las evaluaciones y una mejor estabilidad en comparación con las puntillas Staedtler.

Por otra parte, para evaluar el depósito del hidrogel sobre los PGE se realizaron 3 caracterizaciones microscópicas. Inicialmente se tomaron imágenes en campo claro con un microscopio Distamax K2 de larga distancia, acoplado a una cámara Canon EOS Rebel T5 DSLR. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron a través de un microscopio invertido Nikon Ti-U utilizando el set de filtros de Chroma 49002 con el objetivo de 4x. Y finalmente, se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX) en un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO 15.

De acuerdo con los resultados de microscopía en campo claro (Figura 126A), se observa el depósito del hidrogel en aproximadamente 2 mm del largo de la puntilla, lo que representa un área de  $0.071 \text{ cm}^2$ , el depósito es relativamente homogéneo con algunas regiones de alta intensidad localizada. Adicionalmente, debido a la fluorescencia generada por el entrecruzamiento del polímero (BPEI) con los grupos aldehído, es posible identificar a través de microscopía de fluorescencia el depósito del hidrogel (Figura 126B). A través de las evaluaciones por SEM-EDX es posible identificar la presencia de E) oxígeno, F) osmio y G) fósforo sobre la superficie del electrodo de D) carbono. La presencia del osmio se espera por la composición del polímero redox, el fósforo proviene de la solución

amortiguadora de pH empleada en la inmovilización y análisis. Con respecto al oxígeno, está distribuido de manera homogénea a través del depósito y proviene de la enzima y los iones fosfato. Por otra parte, como es de esperarse, es evidente que la señal del carbón disminuye en la región modificada en comparación con el área de la puntilla que no tiene el depósito del hidrogel.

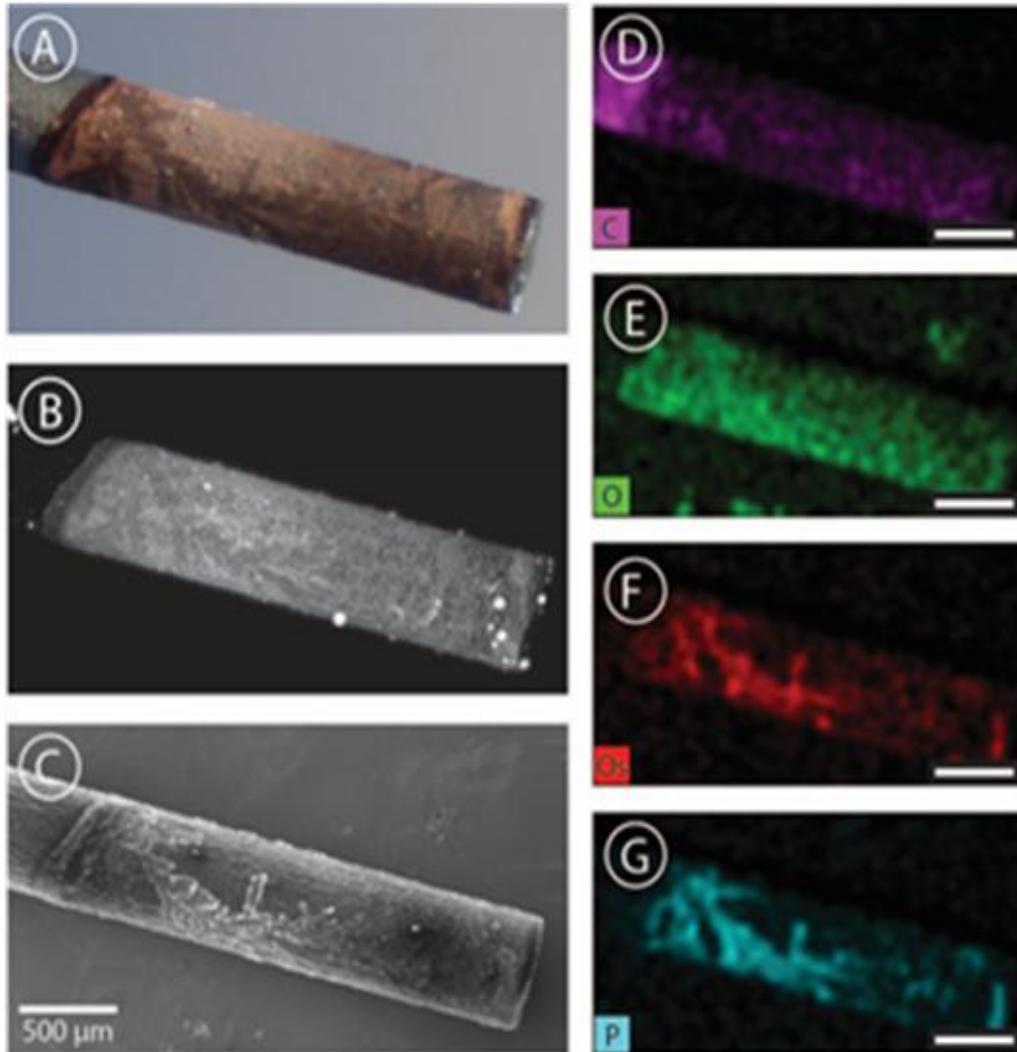


Figura 91. A-C) Imágenes del depósito de hidrogeles OsBPEI/GOx/GA sobre PGE. A) Campo claro, B) fluorescencia y C) microscopía electrónica de barrido. D-G) Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX) de D) carbono, E) oxígeno, F) osmio y G) fosforo.

### 3.6 Conclusiones

De acuerdo con el objetivo IV, en las evaluaciones con los electrodos enzimáticos de primera generación no fue posible detectar glucosa en matrices complejas como el medio de cultivo RPMI-1640. Sin embargo, con las modificaciones en la composición del hidrogel ha sido posible detectar glucosa en medio de cultivo, no obstante, aún se observa la señal de interferentes.

Con respecto a los objetivos V y VI, en las evaluaciones con electrodos enzimáticos de segunda generación, se determinó que es posible detectar glucosa en matrices complejas como el medio de cultivo RPMI-1640 con hasta 10 % de SFB en SPE y PGE. En las evaluaciones realizadas en SPE (utilizando PB 0.1 M pH 7.4), entre los hidrogeles de OsBPEI/GOx/EGDGE y OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM, los que emplean GA como entrecruzador presentan mejores parámetros de LOD, LOQ,  $j_{max}$ , sensibilidad y estabilidad. Sin embargo, cuando son evaluados en medio de cultivo RPMI-1640 con SFB 5 %, EGDGE es el mejor candidato. Una vez que se realizan las evaluaciones en PGE, se obtienen resultados similares, siendo EGDGE el que presenta las mejores características.

Por otra parte, en las evaluaciones con interferentes, la presencia de concentraciones mayores a 5 mM de AL en el medio no genera problemas en la detección de glucosa. Por su parte, concentraciones mayores de AA 1 mM y AU 0.5 mM en el medio generan complicaciones en la detección de glucosa. Sin embargo, no se encuentran dentro del rango de concentraciones máximas reportadas y no representan un problema para la detección de glucosa en medios de cultivo celular.

Finalmente, en la evaluación de puntillas de carbono como WE se seleccionó la marca Foray por el potencial de oxidación, la estabilidad, el rango de corriente y linealidad. Adicionalmente, es capaz de realizar las evaluaciones de glucosa en medios de cultivo complejos. Por lo tanto, serán utilizados como WE en las secciones posteriores.

# CAPÍTULO IV

## Chip Microfluídico

## Capítulo IV – Chip microfluídico

### 4. Microfluídica

La microfluídica puede definirse como la ciencia e ingeniería de los sistemas en los cuales el comportamiento de los fluidos difiere de la teoría convencional de flujo debido a la pequeña escala del sistema. Incorpora actividades o procesos que se benefician de las ventajas de la manipulación y el control de fluidos a escalas inferiores a la milimétrica. Comprende rangos entre  $10^{-6}$  –  $10^{-12}$  L (Figura 92), en una red de canales con dimensiones en la escala de  $10^{-6}$  m. Sin embargo, también se consideran los dispositivos y métodos para controlar y manipular fluidos con escalas de longitudes menores a algunos milímetros. Suele aceptarse dentro de la descripción de dispositivos microfluídicos cuando las cantidades que se manipulan son pequeñas, independientemente de que alguna parte de los dispositivos sean relativamente más grandes <sup>110–112</sup>.

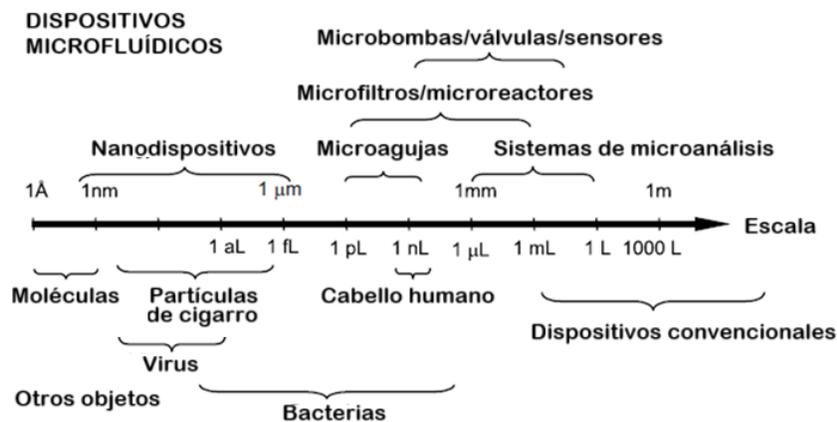


Figura 92. Medidas características utilizadas en los dispositivos microfluídicos <sup>112</sup>.

Las propiedades físicas de los fluidos en microescala generan cambios en el comportamiento de líquidos y mezclas, haciéndolos más predecibles. Estos efectos explican las ventajas de la microfluídica, como reacciones más rápidas, análisis simultáneos de analitos, ahorro de reactivos y tiempos más cortos de experimentación <sup>110–112</sup>. Considerando las ventajas mencionadas, las aplicaciones principales son el microanálisis, utilizando plataformas *lab-on-a-chip* o microsistemas de análisis total ( $\mu$ TAS) <sup>113,114</sup>, microceldas de combustible <sup>115</sup>, síntesis <sup>116</sup>, o bien, cultivo celular; donde se evalúan modelos 2D o plataformas complejas como los modelos *organ-on-a-chip* <sup>117,118</sup>. Debido a su potencial, la evaluación de cultivos celulares ha ganado gran popularidad en los últimos años por su impacto en la evaluación de enfermedades, en el desarrollo de fármacos y la medicina

personalizada<sup>119–121</sup>. Por esta razón, es importante el desarrollo y caracterización de materiales y técnicas que permitan el desarrollo de estas plataformas.

Actualmente, se ha estudiado el potencial de algunos polímeros por la biocompatibilidad y la posibilidad de modificar sus superficies. Los más utilizados en aplicaciones microfluídicas son termoestables y se clasifican en termoplásticos, elastómeros o termoplásticos elastómeros. Los termoplásticos pueden ser frágiles o flexibles, según el contenido de regiones cristalinas y amorfas, su grosor y su fabricación, algunos ejemplos son el policarbonato, poliestireno y poli(metil metacrilato). Por otra parte, los elastómeros son flexibles y estirables, características que pueden ajustarse según su preparación. Los termoplásticos elastómeros son copolímeros que tienen características de ambos grupos como poliuretanos y poliamidas termoplásticos<sup>122,123</sup>. De estos, los elastómeros de siloxano son muy populares en la investigación; son polímeros sintéticos con la unidad de dimetilsiloxano ((Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)O<sub>n</sub>) repetida en su estructura. El polidimetilsiloxano (PDMS) es el más común y reconocido por sus propiedades; es biocompatible, inerte químicamente, no es tóxico y no es inflamable. Su conformación con largas cadenas y su baja temperatura de fusión resulta en una gran flexibilidad y elasticidad, haciéndolo ideal para la fabricación de prototipos microfluídicos. Tiene gran transparencia óptica, lo que permite hacer observaciones en los dispositivos. Es permeable a gases, lo que lo hace ideal para el manejo celular. Sin embargo, tiene algunas desventajas, como su naturaleza hidrofóbica (es posible modificar la superficie con diferentes procedimientos para volverlo hidrofílico en cierta medida<sup>124–128</sup>) y su incompatibilidad con algunos solventes<sup>122,123,129–132</sup>.

#### 4.1. Litografía suave

La litografía suave simplifica la producción de diferentes modelos de investigación, consiste en la elaboración de moldes y la fabricación de piezas a partir de estos, las piezas se realizan usualmente en PDMS. El PDMS utilizado se encuentra comúnmente en dos componentes, una base y un agente curante. Los grupos de hidruro de silicio presentes en el agente curante, reaccionan con los grupos vinilo presentes en la base y forman un elastómero sólido entrecruzado. Los componentes se mezclan típicamente en una relación 10:1 (v/v) base : agente curante, la mezcla se coloca en el molde de interés y se cura. Una vez solidificado se retira mostrando el patrón del molde utilizado (Figura 93)<sup>133,134</sup>. La técnica es capaz de reproducir estructuras en el rango de nanómetros, sin embargo, el punto crítico es la elaboración de los moldes, los cuales pueden fabricarse por diversas técnicas, siendo fotolitografía la más popular, impresión 3D, etc<sup>133</sup>.

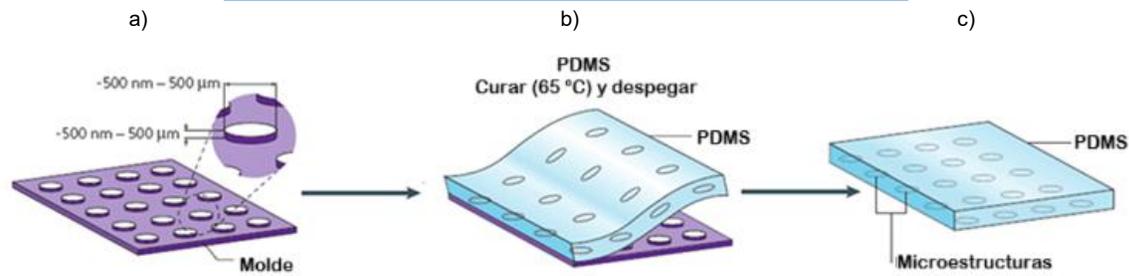


Figura 93. Ilustración de la técnica Litografía suave. a) El molde es una pieza de silicio con patrones circulares. b) Se agrega PDMS al molde. c) Se obtiene una pieza de PDMS con el patrón del molde<sup>135</sup>.

## 4.2 Fotolitografía

La fotolitografía es un proceso utilizado mayormente para la manufactura de circuitos integrados. Sin embargo, no se limita únicamente a ese sector; es ampliamente utilizada en el desarrollo de dispositivos microfluídicos para análisis, cultivo celular, síntesis, etc. Se basa en la transferencia fotográfica de un patrón deseado a una superficie para su futuro procesamiento<sup>136</sup>. Para obtener buenos resultados al utilizar esta técnica, es necesario seleccionar los materiales adecuadamente para fabricar el diseño de interés. Posteriormente se realizan una serie de tratamientos para depositar los materiales deseados con el patrón formado (Figura 94). Dichos tratamientos consisten en una serie de pasos básicos: limpieza de sustratos, depósito de la fotoresina (*spin coating*), tratamiento de calentamiento, exposición, revelado, limpieza y un tratamiento de calentamiento final. El proceso tiene limitaciones para superficies que no son planas; sin embargo, actualmente ha mejorado y cubre rangos más amplios de distintas topografías y tamaños. El desempeño de la técnica está determinado por la resolución (el tamaño mínimo que puede ser transferido con precisión) y los tiempos que toma elaborar los patrones (el número de patrones que pueden ser transferidos por hora)<sup>137</sup>.

Actualmente es la técnica más popular para el desarrollo de los dispositivos microfluídicos. Normalmente se realizan moldes depositando resinas en materiales como el silicio y el vidrio<sup>133,134</sup>. Es necesario llevar a cabo el procedimiento dentro de cuartos limpios<sup>138</sup> y el método es ideal para el diseño y evaluación de prototipos pero no para la elaboración industrial de los mismos.

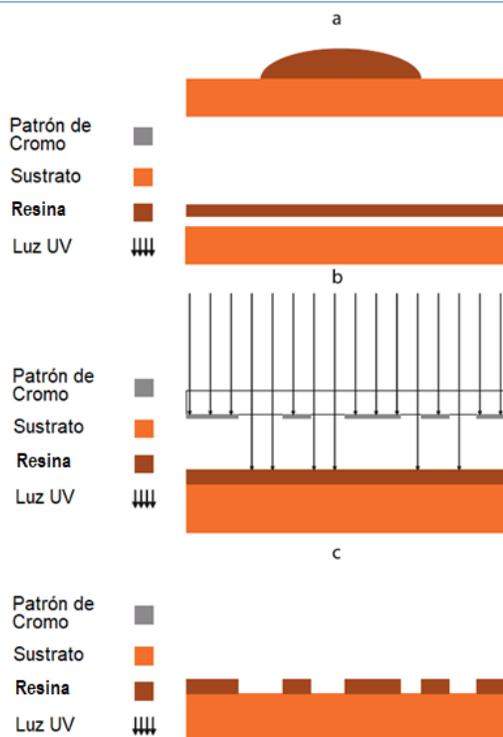


Figura 94. Fotolitografía. a) La imagen superior muestra el depósito de la fotoresina en el sustrato y la imagen inferior muestra la fotoresina distribuida de manera uniforme. b) El sustrato se expone a luz UV. c) Se observa el patrón de interés<sup>136</sup>.

### 4.3 Impresión 3D

La impresión 3D puede llevarse a cabo por diversas técnicas. La impresión por filamento se basa en fundir un filamento termoplástico que se deposita capa por capa para formar una pieza; sin embargo, es la técnica con menor resolución<sup>139-142</sup>. La impresión con tintas se basa en el depósito de tintas fotocurables capa por capa y ofrece una mejor resolución que la impresión por filamento<sup>143,144</sup>. La impresión por resina se basa en el depósito capa por capa de resinas fotopolimerizables, presenta mejor resolución que los dos procesos anteriores y maneja bajos costos<sup>145,146</sup>. Sin embargo, los materiales disponibles para este tipo de técnicas no han sido diseñados específicamente con propósitos biológicos. Podemos encontrar algunas evaluaciones de biocompatibilidad de dichos materiales, pero en muchos casos pueden usarse simplemente para realizar moldes al igual que en fotolitografía y no es un punto crítico. Debido a esto, actualmente ha incrementado el uso de impresión 3D para la fabricación de dispositivos microfluídicos<sup>147,148</sup>.

#### 4.4 Diseño y fabricación de chips microfluídicos

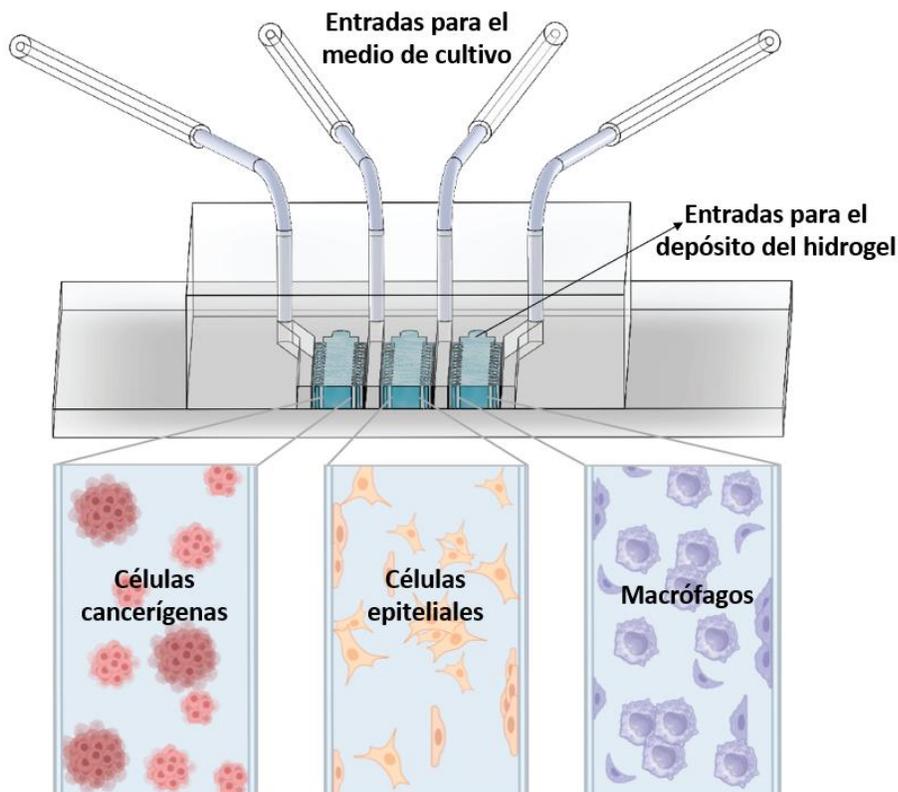


Figura 95. Diseño y configuración del chip microfluídico con tres cámaras de cultivo interconectadas y 4 canales para suministrar medio de cultivo celular.

Es de interés común contar con tecnología que nos permita evaluar la respuesta celular ante estímulos, diferentes parámetros metabólicos, interacciones celulares y diferentes tratamientos para conocer a detalle el comportamiento de las enfermedades. Sin embargo, para lograr tal objetivo, es necesario emular el ambiente fisiológico celular y monitorear los parámetros que puedan afectar la viabilidad, el crecimiento, la diferenciación y función celular. Los cultivos celulares en dispositivos microfluídicos pueden realizarse en 2D o 3D dependiendo del objetivo de la investigación. De acuerdo con las características de estos dispositivos es posible controlar las condiciones de cultivo y evaluar diferentes estímulos simultáneamente<sup>119-121</sup>. Factor que facilita el estudio de la respuesta celular en diferentes escenarios. Sin embargo, también es necesario monitorear y controlar las condiciones del cultivo para la viabilidad celular, como el pH, oxígeno, lactato, glucosa, etc. El monitoreo de los niveles de glucosa es importante para evaluar la proliferación<sup>17,55,56</sup> y función mitocondrial<sup>4,57,58</sup>, relacionadas con la actividad metabólica celular, así como para monitorear un flujo constante para el desarrollo y viabilidad celular. Puntos clave en el desarrollo del proyecto, donde en la primera etapa es de interés monitorear

los niveles de glucosa durante diversos experimentos. Sin embargo, para etapas futuras, es importante evaluar glucosa en tiempo real para analizar características celulares más específicas.

En una etapa más avanzada del proyecto se plantea crear una plataforma de cáncer de mama on-a-chip. Es necesario que el modelo permita el desarrollo y la evaluación de tres líneas celulares (luminal A de cáncer de mama-MCF 7, células endoteliales-EA.hy 926 y macrófagos-RAW 264.7) en compartimentos separados para simular el microambiente tumoral de cáncer de mama y analizar el comportamiento entre los componentes de forma controlada (Figura 95). Es necesario permitir la comunicación celular a través de los canales, lo cual puede lograrse a través de membranas, hidrogeles o el diseño de los canales. Adicionalmente, para cumplir con el objetivo, es necesario monitorear los parámetros celulares antes mencionados ( $O_2$ , pH, glucosa, lactato, etc.). Siendo el enfoque principal el desarrollo de un biosensor electroquímico de glucosa, se plantea que los electrodos sean integrados en cada cámara de cultivo para evaluar las variaciones en cada línea celular (Figura 96).

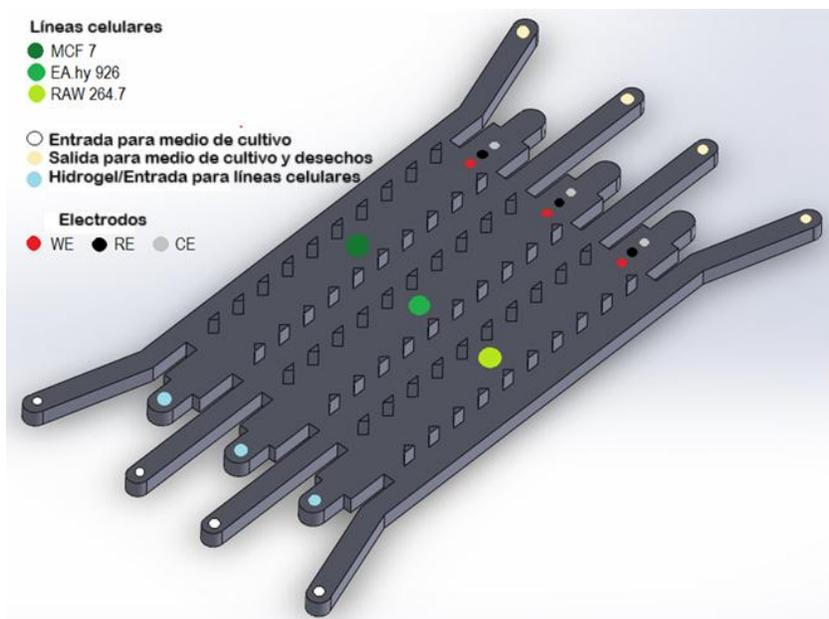


Figura 96. Integración de sensores en un chip microfluídico de cultivo celular.

Inicialmente, para evaluar la viabilidad del proyecto se diseñó una cámara de cultivo con un solo canal para las primeras evaluaciones. El molde con 15 canales individuales se diseñó en SolidWorks y se obtuvo por impresión 3D (Figura 97). Cada canal mide 1.6 x 18 mm con una altura de 0.8 mm. Se utilizó la impresora *Elegoo Mars 3* para la impresión del diseño a través de software *Chitubox*. La resina empleada fue *Esun High Temp Resin* que soporta temperaturas de hasta 150 °C. Una vez que se

obtiene el diseño impreso es necesario enjuagar abundantemente con isopropanol. Se coloca la pieza en el equipo *Wash&Cure 2.0* de *Anycubic* por 10 min en la sección de lavado con isopropanol y posteriormente 10 min en la sección de curado con luz UV. Finalmente se coloca en el horno de secado (MTI Corporation) a 150 °C por 1 h (Figura 97).

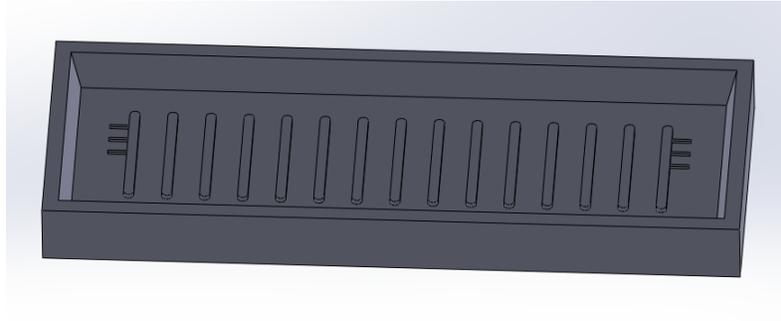


Figura 97. Diseño del molde de canales microfluídicos.



Figura 98. Molde para fabricación de canales microfluídicos.

Una vez que se tiene el molde es necesario obtener piezas de PDMS, para su fabricación se mezcla homogéneamente (10:1) el prepolímero SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Base y el agente curador SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Curing. La mezcla se coloca en los moldes obtenidos y se ingresa en un desecador (Nalgene®) durante 20 minutos al vacío para eliminar las burbujas formadas. Posteriormente, para el curado, se coloca en un horno de secado (MTI Corporation) a 60 °C durante 3 horas. Finalmente se deja enfriar y se separa la pieza del molde.

Una vez que se obtienen las piezas en PDMS se cortan individualmente y se realizan las perforaciones necesarias en cada canal con el *puncher* adecuado, en nuestro caso se utilizó uno con diámetro interno de 500 µm. Posteriormente se seleccionan sustratos de vidrio para unir los moldes de PDMS por sellado con plasma. Como primer paso se adecuan las piezas que se desean sellar, es necesario que estén completamente limpias y secas. Se introducen las piezas en el equipo (MTI PDC-001-LD) con la

cara que se va a sellar hacia arriba. La cámara se lleva a vacío y se estabiliza a una presión de  $7 \times 10^{-1}$  torr. Se activa la radiofrecuencia en intensidad media y se deja por 75 s. Las piezas se extraen y se unen de forma manual inmediatamente (Figura 99).

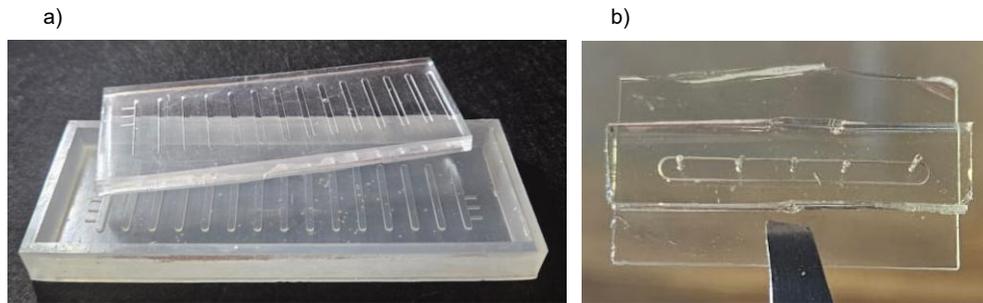


Figura 99. a) Elaboración de piezas de PDMS con el molde obtenido por impresión 3D. b) Elaboración de chip microfluídico en PDMS-vidrio.

En esta técnica, el plasma modifica la superficie del polímero y el vidrio para facilitar la unión de los mismos. Después de la primera aplicación de energía, las moléculas de gas, como oxígeno, son convertidas en intermediarios inestables que pueden reaccionar con la superficie. Algunos de los mecanismos entre el plasma con la superficie incluyen radicales de oxígeno. Estos radicales inducen posteriormente la ruptura de enlaces, transferencia de radicales, oxidación y deprotonación para generar grupos funcionales en la superficie (hidroxilo y carboxilo). Para algunos polímeros como PDMS, esto implica que pueden ser sellados irreversiblemente con una gran variedad de materiales (PDMS, vidrio, silicio, etc.) a través de la oxigenación de superficies. Los materiales son colocados en el plasma de aire y en el PDMS induce la formación de grupos silanol (Si-OH) que reemplazan los grupos metilo (Si-CH<sub>3</sub>) de la superficie (Figura 100). En consecuencia, la reacción genera la unión irreversible por los enlaces covalentes de siloxano (Si-O-Si) formados por condensación. Sin embargo, es posible el daño de las superficies. En el caso del oro, que es inerte al plasma, no hay sitios de unión para reaccionar con el PDMS<sup>136</sup>.

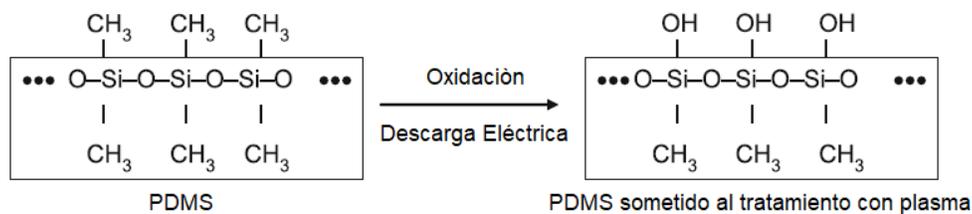


Figura 100. Esquema del tratamiento con plasma a una superficie de PDMS<sup>136</sup>.

Todas las piezas de PDMS fabricadas en el proyecto son realizadas con el mismo procedimiento y materiales.

Al obtener un molde funcional a través de impresión 3D se diseñó el chip microfluídico de cultivo. De acuerdo con el diseño de Dornhof et. al, se diseñó un chip microfluídico con el software SolidWorks. Cabe mencionar que se realizaron modificaciones en las dimensiones y en el diseño general del chip (Figura 101). Se diseñó un chip más grande que permite el cultivo de una línea celular extra (Figura 102) de acuerdo con las necesidades del proyecto. De acuerdo con el artículo, las estructuras triangulares que conectan los canales permiten la entrada del medio de cultivo por difusión, disminuyendo el daño celular y permitiendo la comunicación entre las cámaras de cultivo<sup>35</sup>.

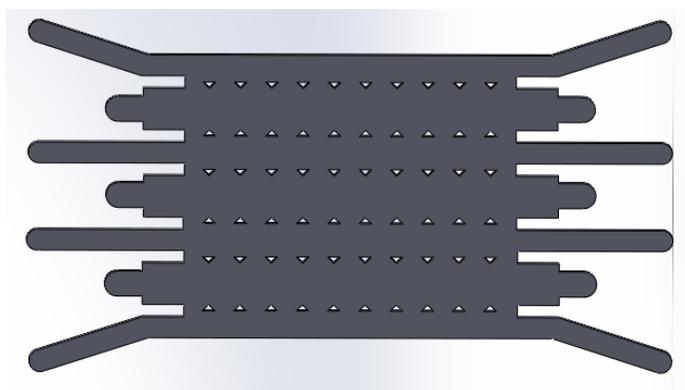


Figura 101. Diseño del chip microfluídico para tres líneas celulares.

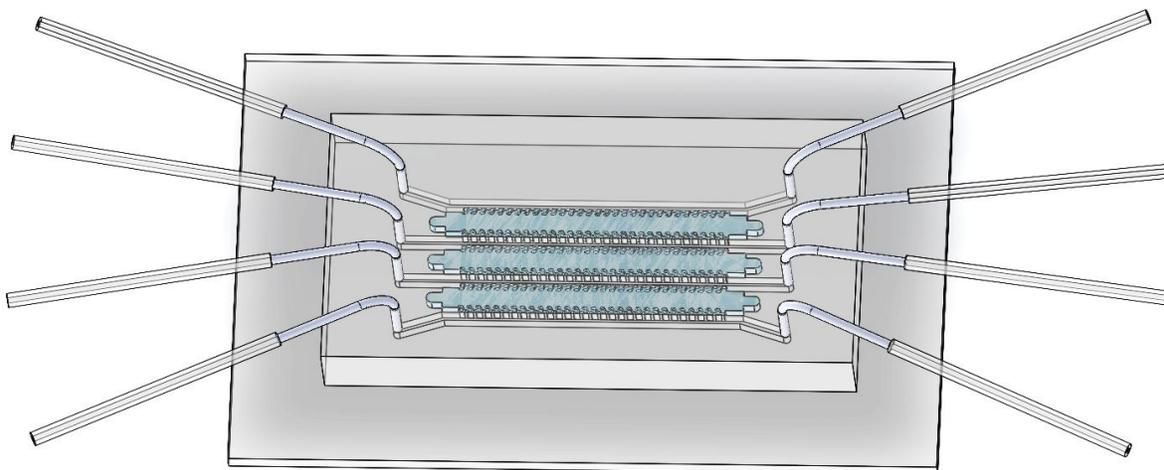


Figura 102. Esquema del chip microfluídico para tres líneas celulares.

Se realizó el diseño de un molde (Figura 103a) del chip microfluídico para evaluar si es factible obtenerlo a través de impresión 3D. El chip microfluídico cuenta con tres cámaras de cultivo (1 x 10 mm) y 4 canales para el flujo de medio de cultivo (0.5 x 10 mm), los cuales están separados 0.3 mm entre sí (Figura 103a). Los canales están conectados por pequeñas estructuras en forma de triángulo, cuya base mide 300  $\mu\text{m}$  y tiene una altura de 150  $\mu\text{m}$ , la separación entre las mismas es de 450  $\mu\text{m}$ . Para su fabricación se utilizó el mismo procedimiento descrito para el chip microfluídico de un canal.

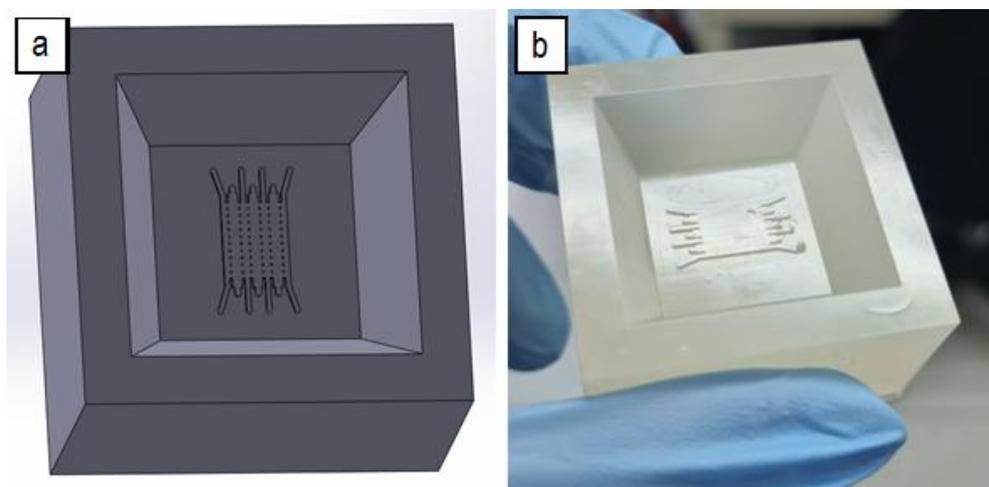


Figura 103. a) Diseño del molde de un chip con 3 cámaras de cultivo para impresión 3D. b) Molde realizado por impresión 3D de un chip con 3 cámaras de cultivo.

Sin embargo, en las evaluaciones de molde (Figura 103b), las estructuras internas no están bien definidas, motivo por el cual se realizaron pruebas con diferentes tiempos de exposición para evaluar si es factible mejorar las condiciones. En el diseño de prueba se colocaron tres canales, los de los extremos de 0.5 x 5 mm y el del medio de 1 x 5 mm, separados por 0.3 mm. En el primer canal se colocaron triángulos con base de 150  $\mu\text{m}$  y altura de 75  $\mu\text{m}$ , en el segundo canal, triángulos con base de 300  $\mu\text{m}$  y altura de 150  $\mu\text{m}$ . En el último canal se colocaron triángulos con base desde 400-100  $\mu\text{m}$ , con intervalos de 50  $\mu\text{m}$  y siendo la altura  $\frac{1}{2}$  de la base (Figura 104a). En la impresión del diseño se evaluaron tiempos de exposición desde 9 a 3 s (Figura 105), donde se observaron estructuras más definidas y la separación adecuada entre canales utilizando 3 s (Figura 105b). No obstante, no fue suficiente para obtener la definición necesaria.

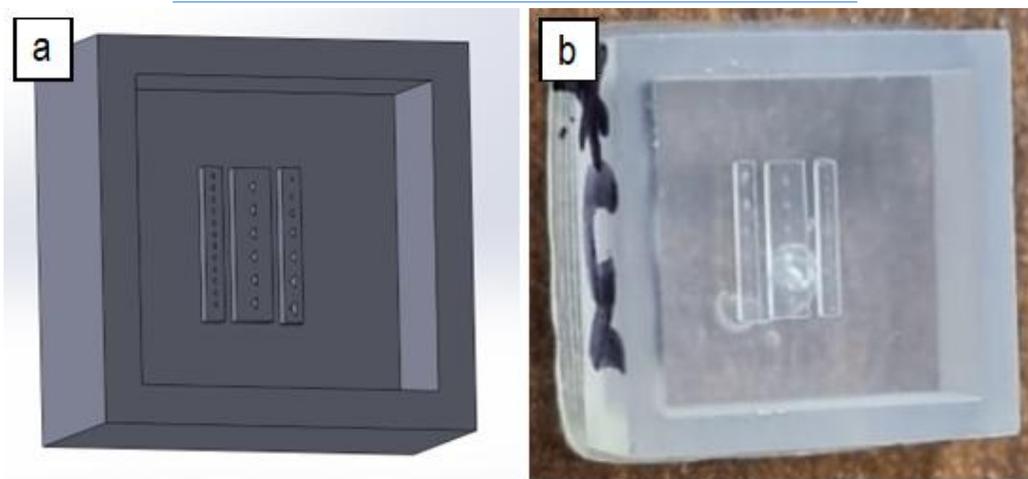


Figura 104. a) Diseño de prueba para impresión 3D. b) Molde realizado por impresión 3D del molde de prueba.

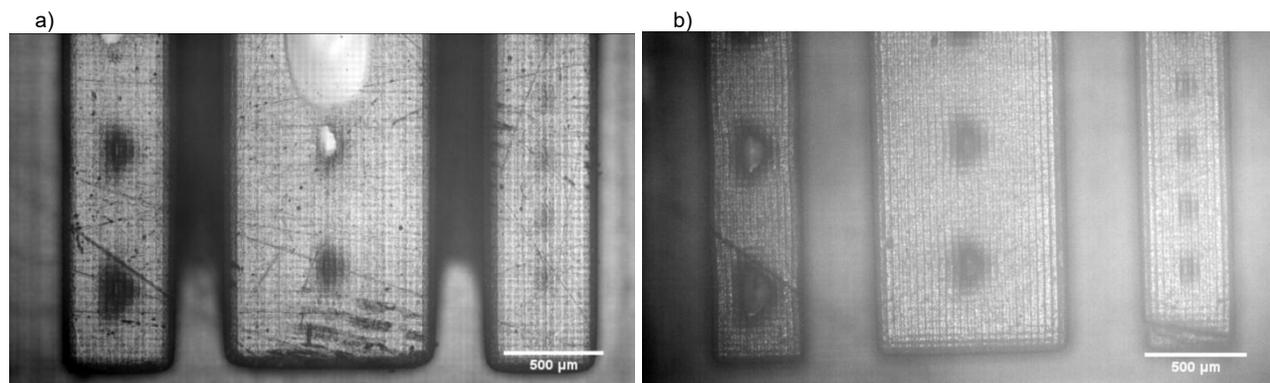


Figura 105. Microscopia óptica (4X) a) Molde de prueba con tiempo de exposición de 9 s. b) Molde de prueba con tiempo de exposición de 3 s.

De acuerdo con los resultados obtenidos se decidió evaluar la fabricación del chip a través de fotolitografía. El proceso se realiza en el cuarto amarillo de la sala blanca de las instalaciones de LABMyN (CIDETEQ) bajo condiciones controladas para evitar la contaminación o el daño de los materiales utilizados. Se seleccionan y limpian obleas de silicio para realizar la impresión del diseño. Se utiliza solución piraña ( $H_2SO_4$  y  $H_2O_2$  relación 3:1 v/v) para la limpieza; los sustratos son sumergidos durante 40 min a  $120\text{ }^\circ\text{C}$ . Una vez finalizado este tiempo, se enjuagan con agua ultrapura para remover los residuos de la solución. Posteriormente, para remover de la superficie el óxido de silicio, la oblea se sumerge y se retira inmediatamente de una solución al 2 % de ácido fluorhídrico. Nuevamente se enjuaga con agua ultrapura para remover los residuos, se secan con una pistola de aire y se colocan en una parrilla de calentamiento (EMS 1000-1) a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  durante 60 min para eliminar restos de agua. La oblea se coloca en el equipo *spin coater* (SCS G808P) para obtener una capa uniforme de la resina,

se depositan 3 ml de fotoresina negativa SU8-50. El equipo es programado a 1,000 rpm durante 20 s para obtener un espesor de la resina de 200  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Una vez transcurrido el tiempo, el sustrato se coloca en la parrilla durante 10 min a 65  $^{\circ}\text{C}$  y 40 min a 95  $^{\circ}\text{C}$ , es importante mencionar que la oblea se retira de la parrilla hasta llegar a temperatura ambiente para evitar la formación de grietas.

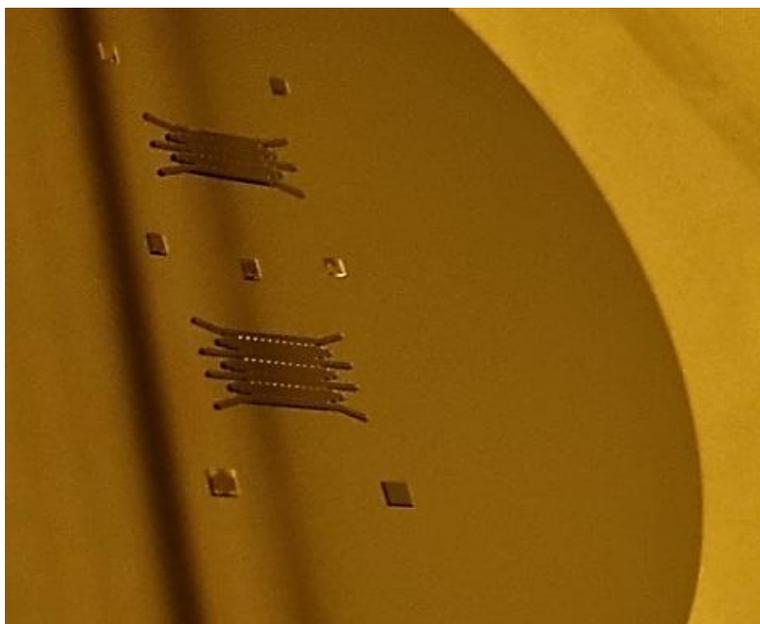


Figura 106. Transferencia de patrones en una oblea de silicio.

Para llevar a cabo la transferencia de los patrones geométricos se utiliza fotolitografía (Figura 106). La oblea se coloca en el generador de micropatrones (Heidelberg  $\mu\text{PG}$  101) y se programan las condiciones de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la resina seleccionada. Para el diseño, la potencia del láser (UV) utilizada fue entre 20 - 30 mW, el tiempo de exposición sobre cada píxel fue entre 60 - 65 % y finalmente, para las veces que pasa el láser sobre el sustrato y el factor de reducción de tiempo se selecciona 2x4. Una vez terminado el proceso, se retira el sustrato del equipo y se coloca nuevamente en la parrilla durante 1 min a 60  $^{\circ}\text{C}$  y 20 min a 95  $^{\circ}\text{C}$ ; finalizado el tiempo se deja la oblea en la parrilla hasta alcanzar temperatura ambiente. Para visualizar el patrón es necesario el uso del revelador de SU8, se sumerge por 30 seg y se coloca inmediatamente en agua ultrapura para detener la reacción. En algunas ocasiones es necesario sumergir nuevamente la oblea en el revelador para obtener una estructura completamente definida. Posteriormente, es necesario enjuagar con agua ultrapura y secar adecuadamente. Nuevamente se coloca en la parrilla por 1 h a 120  $^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se evalúa con el microscopio metalográfico (AmScope FMA050) la correcta transferencia de patrones en toda el área de la muestra.

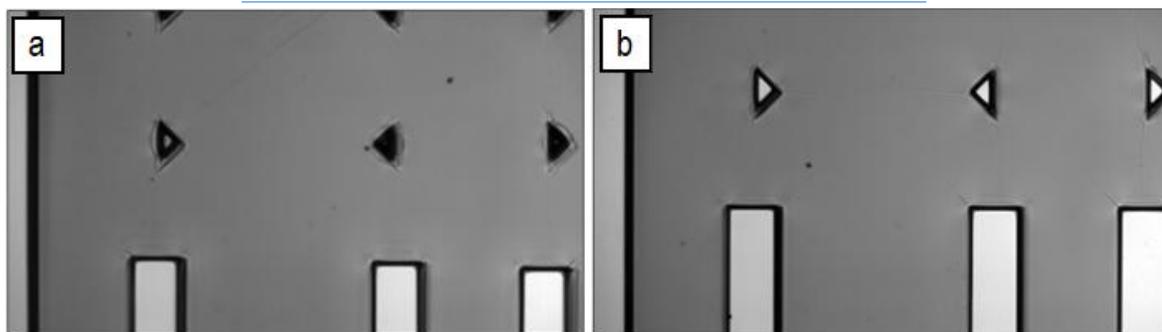


Figura 107. Microscopía óptica (4x) de los patrones en la oblea de silicio. a) Chip de tres canales de cultivo 30 mW 65 %. b) Chip de dos canales de cultivo 20 mW 60 %.

Sin embargo, los triángulos que conectan los canales no están totalmente definidos. Se observan estructuras más fieles al diseño con las condiciones de 20 mW y 60 % (Figura 107b). Con un mayor tiempo de exposición las dimensiones incrementan en el diseño final y esto provoca que las estructuras se cierren (Figura 107a). Por lo tanto, es necesario evaluar cuales son las condiciones más adecuadas para que todas las estructuras queden completamente definidas. Lamentablemente no logramos continuar con las evaluaciones debido a las fallas que presentó el equipo. No obstante, se decidió evaluar el diseño que se obtuvo en la oblea de silicio para depositar el hidrogel para cultivo celular.

Las obleas funcionan como moldes (Figura 106) para obtener piezas de PDMS con el procedimiento descrito anteriormente. Sin embargo, es importante considerar que con el uso de los moldes las estructuras que unen los canales se llenan de PDMS (Figura 108) y es necesario limpiar adecuadamente para mantener elementos funcionales como se observaban en la Figura 107b. De esta manera será posible utilizar continuamente el molde para obtener piezas funcionales (Figura 109).



Figura 108. Microscopía óptica (4x) de los patrones en la oblea de silicio. Chip de dos canales de cultivo 20 mW 60 % después de aplicar PDMS.

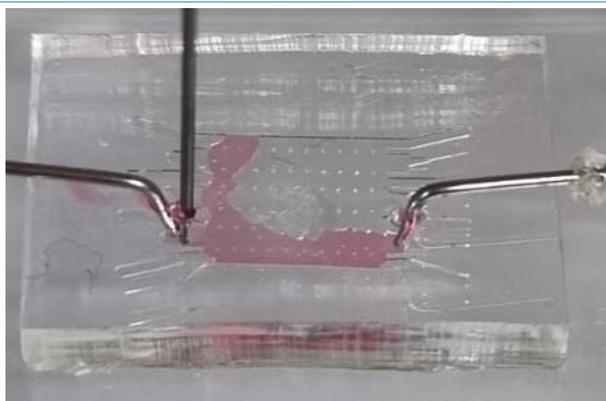


Figura 109. Chip microfluídico de PDMS con tres cámaras de cultivo unido a un sustrato de vidrio.

#### 4.5 Depósito de hidrogeles para cultivo celular en chips microfluídicos

Actualmente hay mayor interés en el área de biomateriales para cultivo celular. Se busca tener un mejor control mecánico (migración y diferenciación celular), estructural y en la composición de los soportes para el cultivo de células, con el objetivo de representar el comportamiento fisiológico de órganos y tejidos. Se han diseñado sustratos de vidrio con patrones específicos, membranas elastoméricas, cerámicas, espumas fibrilares, hidrogeles, etc. Dentro de estos, los hidrogeles son considerados como la opción más prometedora para el cultivo celular. Imitan elementos de la matriz extracelular, tienen mecanismos similares a algunos tejidos y promueven la adhesión celular. Hoy en día hay una gran variedad de hidrogeles, clasificados en naturales o sintéticos, con diferentes ventajas y desventajas de acuerdo con las necesidades de cada diseño experimental<sup>149</sup>.

De acuerdo con el trabajo de la alumna Diana González Ramírez se evaluó la formación de un hidrogel de alginato de sodio dentro de la cámara microfluídica que se observa en la Figura 110. Se introduce la solución de alginato de sodio al 2 % hasta llenar los canales, el chip se coloca 10 min a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se agrega la solución de  $\text{CaCl}_2$  50 mM. Sin embargo, tras varias pruebas no obtuvimos un depósito homogéneo. La formación tan rápida del hidrogel dificulta el paso de la solución de  $\text{CaCl}_2$ . Como resultado hay muchas zonas sin hidrogel. Se agregó colorante vegetal azul a la solución de alginato de sodio únicamente para facilitar la observación. Adicionalmente se observa que las estructuras destinadas para retener el hidrogel en las zonas para el cultivo celular no son adecuadas. En las evaluaciones las soluciones cruzan todos los canales a través de estas como se observa en la Figura 109 donde están llenos todos los canales. Adicionalmente se realizó una prueba con agua con colorante vegetal rojo y azul para evaluar el comportamiento y fugas al agregar estructuras para monitoreo (Figura 111). No se observaron fugas, sin embargo, las estructuras no funcionan como guías

para contener las soluciones.



Figura 110. Depósito de hidrogel de alginato de sodio en chip microfluídico.

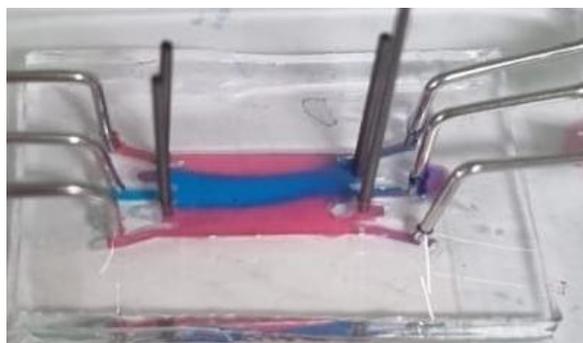


Figura 111. Evaluación del flujo de agua con colorante vegetal en los canales microfluídicos.

Posteriormente se optó por evaluar la formación del hidrogel en el chip microfluídico de tres canales, para depositar el hidrogel únicamente en el canal central. Se introduce en el canal del medio la solución de alginato de sodio al 2 % y en los extremos la solución de  $\text{CaCl}_2$  50 mM con flujo constante (100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) para evaluar la formación del hidrogel. Se realizaron pruebas iniciales con agua y colorantes vegetales como se observa en la Figura 110. Sin embargo, al utilizar las soluciones de alginato de sodio y  $\text{CaCl}_2$  no fue posible obtener un depósito homogéneo del hidrogel por la viscosidad de la solución. Los canales se tapaban inmediatamente impidiendo el flujo de las soluciones.

En consecuencia, se buscaron alternativas de hidrogeles y la modificación del diseño del chip microfluídico para facilitar el depósito de hidrogeles. Las características generales son dos cámaras de cultivo (1.2 x 17 mm) y 3 canales para el flujo de medio de cultivo (0.5 x 17 mm), los cuales están separados 0.3 mm entre sí. Se propusieron 3 diseños para las estructuras que conectan los canales, considerando en cada modelo la separación de estructuras de 25, 50 y 75  $\mu\text{m}$  para determinar el modelo más adecuado. En la Figura 112 se observan los triángulos con una base de 350  $\mu\text{m}$  y altura

de  $150 \mu\text{m}$ <sup>35,150,151</sup>. En la Figura 113 se observan óvalos de  $200 \times 500 \mu\text{m}$ <sup>152</sup>. Y finalmente, en la Figura 114 se observa una estructura más compleja para dificultar el paso del medio, la estructura ocupa un área de  $410 \times 590 \mu\text{m}$ . Los modelos son realizados por fotolitografía en obleas de silicio con SU8-50 (Figura 115) y posteriormente se utilizan para fabricar piezas de PDMS (Figura 116). Sin embargo, debido a las fallas del equipo, únicamente se logró fabricar el molde de las piezas triangulares con separación de 25, 50 y 75  $\mu\text{m}$ , y la pieza del óvalo con separación de 75  $\mu\text{m}$ .

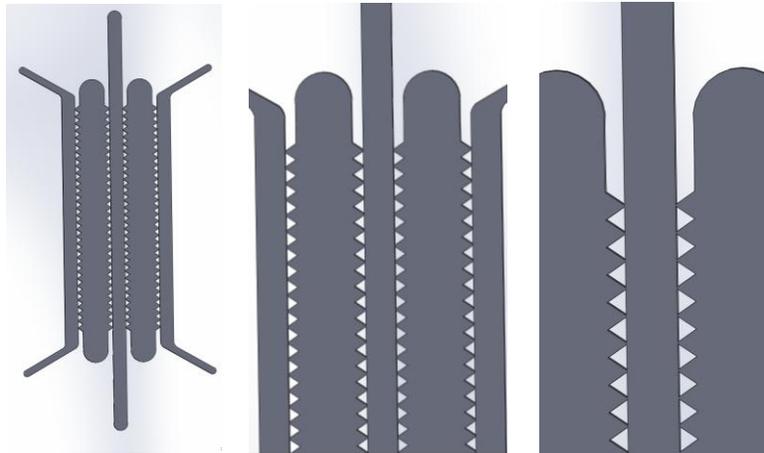


Figura 112. Diseño de chip microfluídico con dos cámaras de cultivo celular. Las estructuras que separan los canales son triángulos con una base de  $350 \mu\text{m}$  y altura de  $150 \mu\text{m}$ .

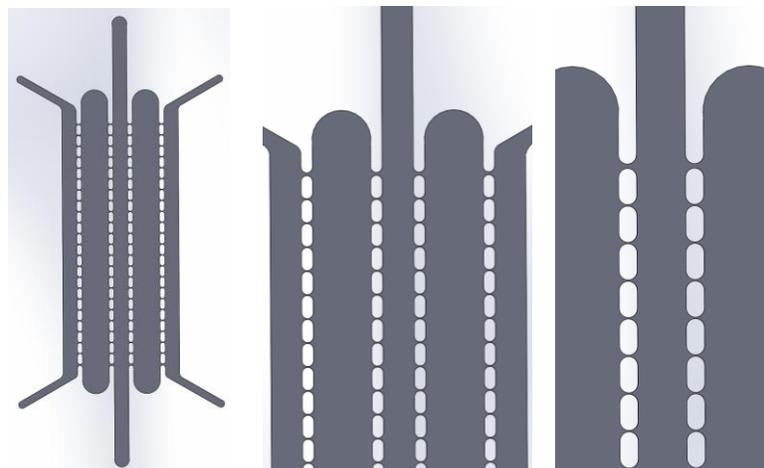


Figura 113. Diseño de chip microfluídico con dos cámaras de cultivo celular. Las estructuras que separan los canales son óvalos de  $200 \times 500 \mu\text{m}$ .

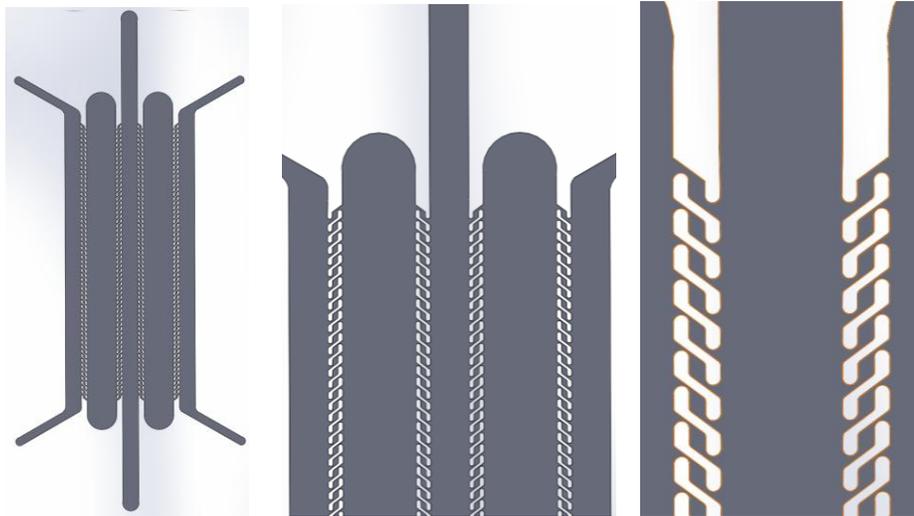


Figura 114. Diseño de chip microfluídico con dos cámaras de cultivo celular. Las estructuras que separan los canales ocupan un área de  $410 \times 590 \mu\text{m}$ .

Con las nuevas piezas se evaluaron diferentes concentraciones de hidrogeles de gelatina/alcohol polivinílico (PVA), colágeno y Matrigel con el apoyo del estudiante Paul Ángeles Casillas. En cada experimento se evaluaron los chips con figuras triangulares con separaciones de 25, 50 y  $75 \mu\text{m}$  y la figura del óvalo con  $75 \mu\text{m}$  de separación.

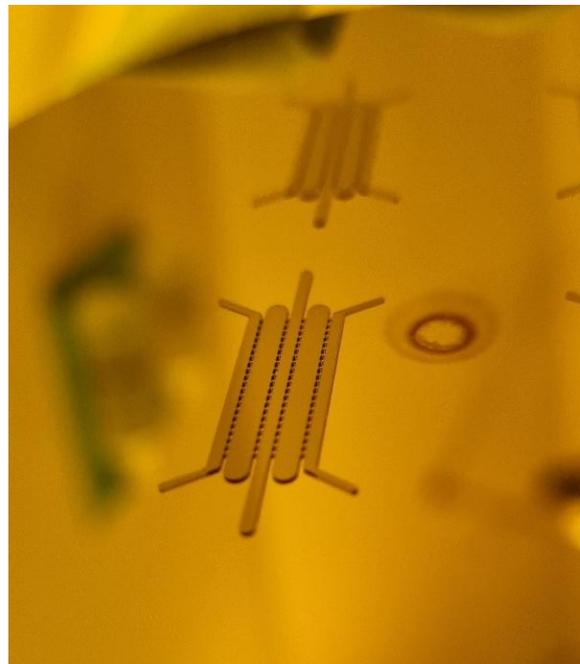


Figura 115. Molde de SU8-50 en oblea de silicio del chip microfluídico con dos cámaras de cultivo celular.

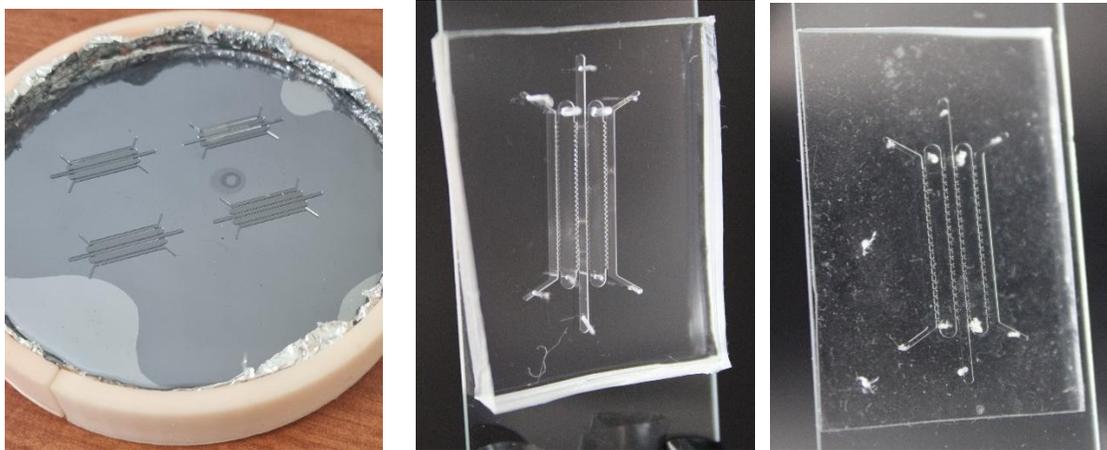


Figura 116. Fabricación de chips microfluídicos en PDMS-vidrio.

Para el sistema de gelatina/PVA se utilizaron tres gelatinas diferentes, porcina, bovina y nutritiva, utilizando el 20 % con cada una de ellas. El hidrogel fue depositado inicialmente en el chip con un canal (Figura 99); una vez depositado se intentó pasar una solución de agua con fluoresceína 1 mM para simular el flujo del medio de cultivo. Sin embargo, en la evaluación se observó que la solución no profundía a través del gel, en cambio lo rompía formando grietas o lo empujaba asemejando un émbolo hacia la salida del canal. Se evaluaron diferentes concentraciones sin obtener resultados favorables. La viscosidad del hidrogel no permitió su depósito en los chips con dos cámaras de cultivo (Figura 117).



Figura 117. Depósito de hidrogel de colágeno al 30 % en el chip microfluídico con dos cámaras de cultivo.

Se analizaron hidrogeles de colágeno al 30 %; sin embargo, la viscosidad del hidrogel dificultaba el depósito en el chip con dos cámaras de cultivo (Figura 117). Se evaluaron diferentes concentraciones, pero por la viscosidad del hidrogel y la presión al depositarlo, generaba que se llenaran todas las

cámaras del chip como se muestra en la Figura 118. No es posible utilizarlo para los experimentos de cultivo celular en los diseños realizados.

Finalmente, se evaluó el depósito de Matrigel (Corning Matrigel Matrix de alta concentración) en los chips con dos cámaras de cultivo, el depósito se realizó con una bomba de jeringa o con una micropipeta. Fue posible depositarlo en los canales delimitados con las estructuras triangulares, sin embargo, pequeños detalles en la manipulación del chip microfluídico provocaban que el hidrogel se esparciera a otros canales. Se evaluó la difusión de una solución de fluoresceína para simular el flujo del medio de cultivo y se observó que la solución difundía en algunas secciones, pero también llegaba a desplazar el Matrigel hacia otros canales. Actualmente se sigue trabajando en la robustez del método para delimitar el depósito del hidrogel para cultivo celular.

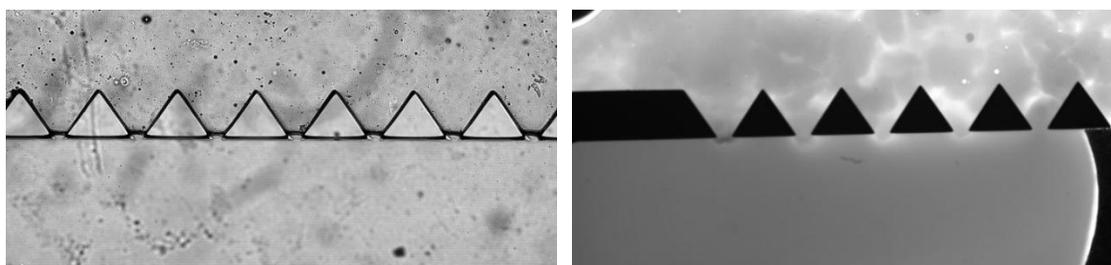


Figura 118. Depósito de Matrigel en la cámara de cultivo de un chip microfluídico. Flujo de una solución de fluoresceína 1 mM a través del canal para medio de cultivo y la cámara de cultivo.

Es importante mencionar que, en las evaluaciones para el depósito de hidrogeles, la dimensión en la separación de las estructuras no marcó una diferencia significativa. Sin embargo, las estructuras triangulares fueron más eficientes para retener el depósito de Matrigel. En este sentido, es importante continuar con las evaluaciones para definir un diseño que permita depositar el hidrogel de manera eficiente.

Debido a los inconvenientes con el equipo de fotolitografía no fue posible continuar con las evaluaciones, no obstante, el equipo de trabajo continúa trabajando con alternativas para cubrir los objetivos planteados. En las evaluaciones posteriores se analizará si es viable la integración de los biosensores en un chip microfluídico.

## 4.6 Conclusiones

De acuerdo con el objetivo II, para el diseño y fabricación de un dispositivo microfluídico para cultivo celular, en los resultados obtenidos con las piezas fabricadas con impresión 3D, se observó que es posible mejorar la definición del molde; no obstante, es necesario evaluar distintas resinas y parámetros para definir si el equipo tiene la resolución necesaria para elaborar los moldes. La fabricación a través de impresión 3D puede mejorar considerablemente los costos y tiempos. Por su parte, los moldes obtenidos mediante fotolitografía mostraron mayor fidelidad al diseño original. Sin embargo, no fue posible avanzar conforme a lo planeado debido a fallas técnicas en el equipo de fotolitografía, las cuales limitaron la producción consistente de moldes. Estas fallas, sumadas a las dificultades logísticas para establecer colaboraciones técnicas con otros grupos de trabajo, influyeron directamente en el cumplimiento de los objetivos planteados en esta etapa. A pesar de ello, una vez que se restablezca la funcionalidad del equipo, se considera viable la obtención de moldes con las características deseadas para aplicaciones en chips microfluídicos destinados al cultivo celular.

Con respecto al diseño del microfluídico, de acuerdo con reportes anteriores<sup>35,150-152</sup> es factible depositar hidrogeles de cultivo celular en zonas específicas y contenidos por diversas estructuras. Sin embargo, no fue posible realizar todas las evaluaciones por las fallas que presentó el equipo de fotolitografía. El equipo de investigación se encuentra trabajando activamente en la reparación y rehabilitación del equipo, con el objetivo de retomar estas evaluaciones en etapas posteriores del proyecto. Los diseños desarrollados hasta el momento representan una alternativa prometedora para simplificar la arquitectura del chip microfluídico para cultivo celular que permita cumplir con las metas del proyecto.

Finalmente, en esta etapa del proyecto no se logró realizar el depósito de hidrogeles de manera reproducible en el chip microfluídico de cultivo celular para realizar las evaluaciones con las líneas celulares. Por lo tanto, no se logró cubrir totalmente con el objetivo VII para la evaluación de glucosa en tiempo real en cultivos celulares y en consecuencia, no es factible llevar a cabo el objetivo III con el cultivo de las líneas celulares en el chip microfluídico. Sin embargo, es factible trabajar en la integración de los biosensores para detección de glucosa, con el fin de determinar si es factible su uso en etapas más avanzadas del proyecto final.

# CAPÍTULO V

Integración del sistema  
electroquímico en un chip  
microfluídico.

## Capítulo V. Integración del sistema electroquímico en el chip microfluídico

### 5.1 Integración de biosensores enzimáticos de segunda generación en un chip microfluídico

De acuerdo con los resultados del capítulo III se trabajó con puntillas de carbono (PGE) Foray como WE y CE, y un alambre de Ag|AgCl como pseudoreferencia. Los PGE tienen aproximadamente un diámetro de 555  $\mu\text{m}$  y un área de 0.0132  $\text{cm}^2$ . Se evaluarán únicamente hidrogeles OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM. La elaboración de los hidrogeles se realiza como se indica en el procedimiento de la sección 3.5.2.2, una vez que se tiene la mezcla del polímero con la enzima y el entrecruzador se toman 3  $\mu\text{L}$  y se depositan sobre la puntilla de carbono (Figura 119). Se coloca el electrodo en el horno de secado (MTI CORP, modelo EQ-DGH) con una temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  por 60 min. Se retira y se enjuaga con agua ultrapura para eliminar el exceso de polímero que no se unió a la superficie.

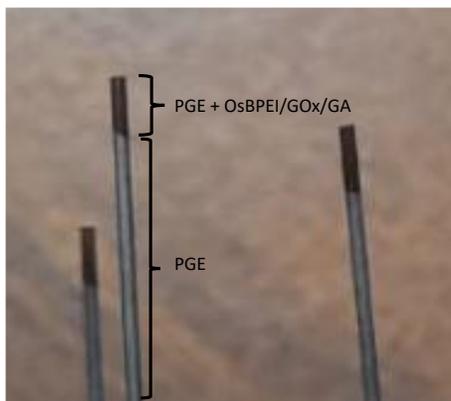


Figura 119. Puntillas de carbono modificadas con OsBPEI/GOx/GA (WE).

Los electrodos modificados con OsBPEI/GOx/GA o OsBPEI/GOx/EGDGE se evalúan en soluciones de glucosa 0 - 100 mM en medio de cultivo RPMI-1640 con 5 % SFB por voltamperometría cíclica (VC) y cronoamperometría (CA). Las evaluaciones cronoamperométricas se emplean para llevar a cabo la curva de calibración, donde se toma la corriente de cada cronoamperograma en  $t = 120$  s.

Para realizar las evaluaciones se utiliza el chip microfluídico de un canal que se fabricó en la sección 4.4 (Figura 99) y se colocan los electrodos como se muestra en la Figura 120. Sin embargo, después de las primeras pruebas fue necesario realizar una modificación en el chip para facilitar la integración

de los electrodos. Se retira el 50 % del grosor de la pieza de PDMS únicamente en la sección donde se colocarán los electrodos y para evitar fugas en la zona de los conectores es necesario dejar el grosor de 6 mm que tiene la pieza de PDMS (Figura 121).

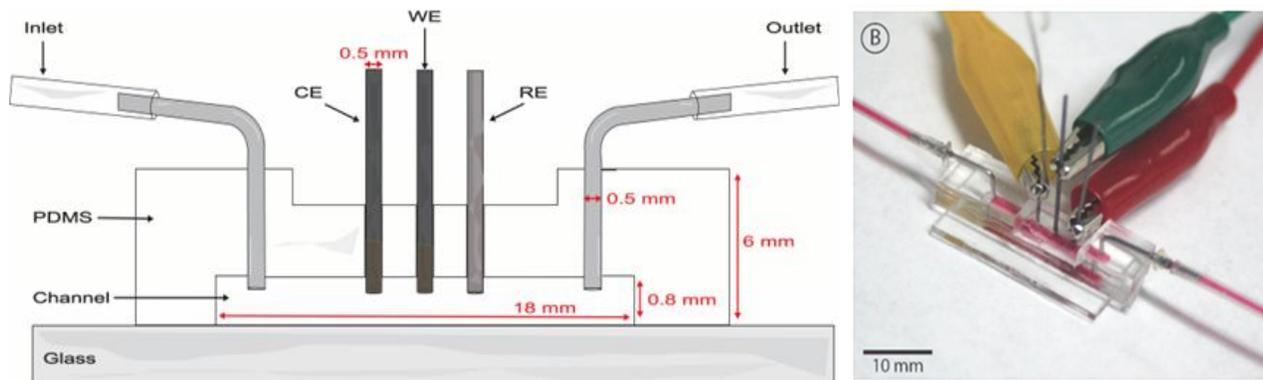
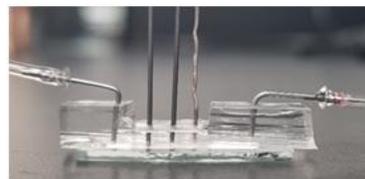
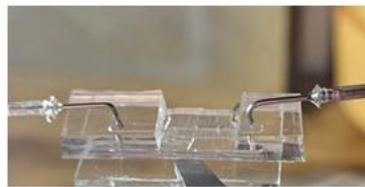
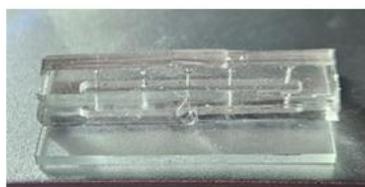


Figura 120. Esquema del chip microfluídico con los electrodos integrados.



Se retira el 50 % del grosor del PDMS en la sección donde se colocan los electrodos y se colocan los conectores.

Se colocan los electrodos.

Figura 121. Modificación del chip microfluídico para la integración de los electrodos.

Una vez que se tiene el chip de la Figura 121 se conecta a una bomba de jeringa para controlar el flujo de la solución a evaluar (Figura 122). Inicialmente se agregaron soluciones de glucosa 0 - 100 mM en medio de cultivo RPMI 1640 con 5 % SFB utilizando una velocidad de 100  $\mu$ L/min sin detener el flujo de las soluciones. Las evaluaciones electroquímicas se realizan después de 2 min al cambiar cada

concentración de glucosa. Los electrodos modificados con OsBPEI/GOx/GA/OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM que fueron integrados en el chip microfluídico tienen un área aproximada de 0.0132 cm<sup>2</sup> (Figura 123).

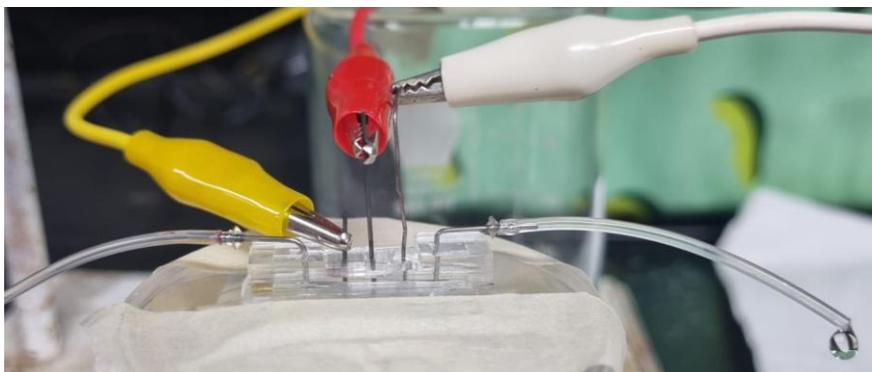


Figura 122. Chip microfluídico integrado con el sistema electroquímico.

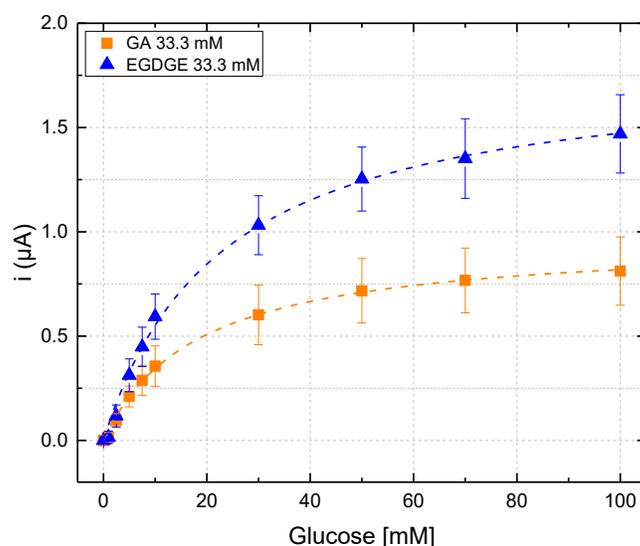


Figura 123. Curva de calibración de glucosa 0 – 100 mM en medio de cultivo RPMI-1640 con 5 % SFB. Las evaluaciones fueron realizadas dentro del canal microfluídico con PGE modificados con el depósito de OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Se utilizó un flujo de 100 μL/h. Las barras de error representan la desviación estándar de tres evaluaciones realizadas en electrodos independientes. Las líneas punteadas representan el ajuste de los datos con respecto a la constante de Michaelis-Menten, calculada a través de un ajuste no lineal.

De acuerdo con los resultados se determinó que es posible detectar glucosa en el chip microfluídico con los PGE modificados (Figura 123). Se observó un incremento en la estabilidad de ambos sistemas,

sin embargo, el rendimiento de los electrodos modificados con GA presentó un decremento. Por otro lado, en las evaluaciones con EGDGE se observó un incremento de sensibilidad,  $j_{\max}$  y menores LOD y LOQ (Tablas 8-10).

Tabla 8. Comparación del LOD, LOQ, sensibilidad, estabilidad, rango lineal y  $R^2$  de PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE.

Hidrogel	LOD (mM)	LOQ (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$ )	Estabilidad (% $j_{\max}$ )	Rango lineal (mM)	$R^2$
PGE en RPMI-1640 (5% FBS) on-chip						
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	1.49	4.97	3.10	52.9	0–7.5	0.989
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	0.50	1.67	4.69	49.9	0–10	0.993

Tabla 9. Comparación de  $K_m^{\text{app}}$  y la  $j_{\max}$  de PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Los datos fueron obtenidos de 3 electrodos independientes.

	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$n^{\text{app}}$ (mL)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$R^2$
Mean									
PGE en RPMI-1640 on-chip									
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	15.2	86.2	23.1	58.2	18.5	74.8	18.0±1.13	72.6±14.3	0.997
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	20.4	147	22.8	141	26.3	121	22.8±1.87	136±39.3	0.996

Tabla 10. Comparación de  $K_m^{\text{app}}$  y la  $j_{\max}$  de PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Datos obtenidos de 3 evaluaciones consecutivas en un mismo electrodo.

	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$j_{\max}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )
PGE en RPMI-1640 on-chip						
OsBPEI/GOx/GA 33.3 mM	17.3	74.1	18.5	41.6	11.9	39.3
OsBPEI/GOx/EGDGE 33.3 mM	25.4	121	30.8	66.5	30.9	60.5

Adicionalmente, se evaluaron PGE con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE dentro del chip microfluídico con un flujo continuo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Los electrodos fueron analizados en medio de cultivo RPMI-1640 con 5 % SFB y 1 % penicilina/estreptomicina. Cada electrodo fue analizado por 12 h,

inicialmente 6 h continuas y 24 h después se evaluó el siguiente periodo de 6 h continuas (Figura 125). En el caso del hidrogel OsBPEI/GOx/GA se observó la pérdida del 44.1 % en los primeros 30 min y tras las 12 h de evaluación el 85.3 % (Figura 124). En cambio, con OsBPEI/GOx/EGDGE en los primeros 30 min se tuvo una pérdida del 52.7 % y tras las 12 h de evaluación el 93.5 % (Figura 124). Por lo tanto, en las evaluaciones continuas al utilizar GA como entrecruzador se obtiene mayor estabilidad. Sin embargo, en evaluaciones anteriores en medio de cultivo el entrecruzador EGDGE mostraba mayores  $j_{\max}$  y estabilidad.

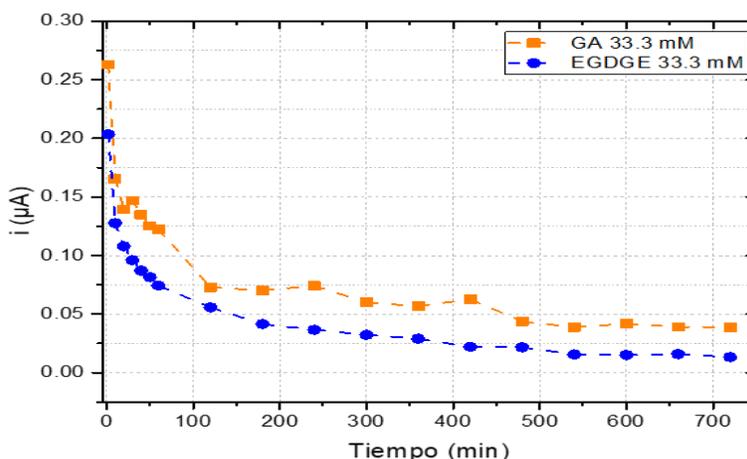


Figura 124. Prueba de estabilidad en PGE con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Las evaluaciones se realizaron en el chip microfluídico con un flujo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

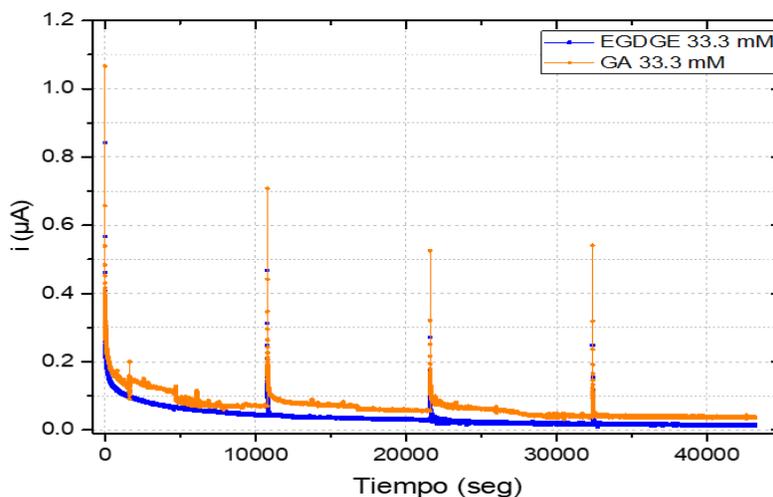


Figura 125. Cronoamperometría de la prueba de estabilidad realizada con PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Las evaluaciones se realizaron en el chip microfluídico con un flujo continuo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Adicionalmente, se evaluó la capacidad de respuesta del biosensor (OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE) en 3 electrodos independientes para cada composición. Se delimitó el área de los PGE con PDMS y se evaluó en soluciones de PB 0.1 M pH 7.4 con glucosa 4.5 o 5 mM. Se realizaron 10 evaluaciones continuas, iniciando por la concentración de 4.5 mM, intercalando las dos concentraciones de glucosa. Cabe mencionar que no se realizó ningún procedimiento de limpieza entre evaluaciones. Sin embargo, se observa el efecto contrario; es posible ver una diferencia en corriente entre ambas soluciones, donde las mayores corrientes las presenta la solución con glucosa 4.5 mM (Figura 126). Esto podría explicarse a que no es significativo el cambio en la corriente entre dichas concentraciones por el efecto de la estabilidad de los electrodos, o bien, por la preparación incorrecta de las soluciones.

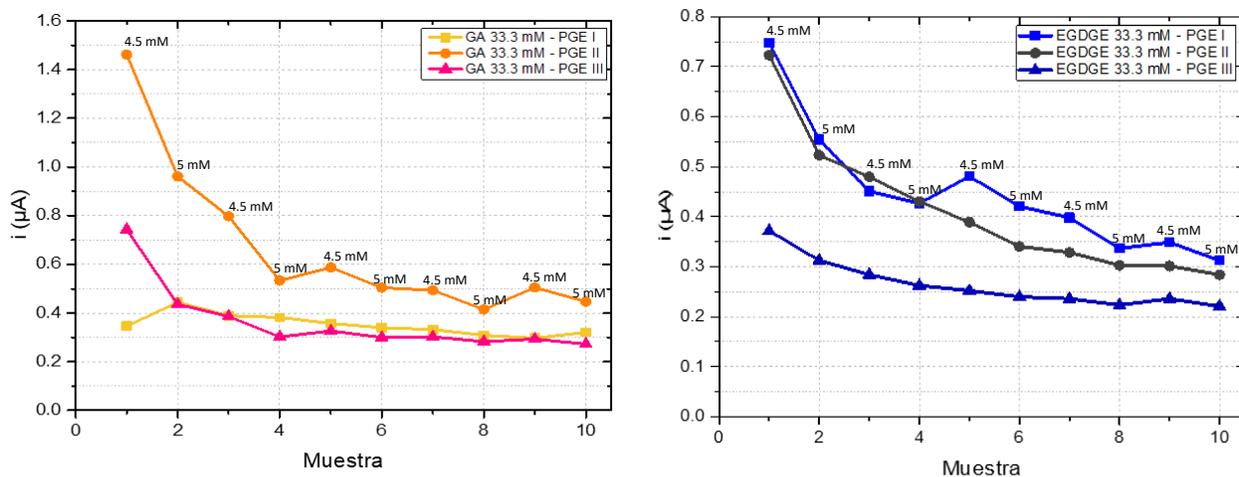


Figura 126. Capacidad de respuesta de PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE. Soluciones 4.5 y 5 mM de glucosa en PB 0.1 M pH 7.4.

De acuerdo con los resultados, es posible concluir que los PGE modificados con OsBPEI/GOx/GA u OsBPEI/GOx/EGDGE son adecuados para realizar evaluaciones dentro del chip microfluídico en matrices complejas; sin embargo, es necesario mejorar la estabilidad sistema para lograr evaluaciones por tiempos prolongados. No obstante, es importante recalcar que el uso de los electrodos en medios complejos no representa un problema, las muestras no necesitan un pretratamiento para ser evaluadas. Adicionalmente, el uso de biosensores enzimáticos de segunda generación no depende de la concentración de  $O_2$  en el medio, siendo candidatos para evaluaciones en escenarios de hipoxia y también reducen significativamente la producción de  $H_2O_2$ , siendo mejores candidatos para detectar glucosa en contacto directo con las células.

Por otra parte, de acuerdo con la literatura, el GA se ha utilizado para inmovilización celular, donde se reporta que concentraciones de 0.1 % (v/v) pueden mantener la actividad celular e incrementar la vida media<sup>153</sup>. Sin embargo, también se ha reportado que es citotóxico<sup>154</sup>. El GA reacciona con los residuos de aminas presentes en la superficie de las células<sup>155</sup> y puede funcionar como un estabilizador para algunas enzimas, incluyendo GOx<sup>153</sup>. Por su parte, con EGDGE se ha reportado su uso para la producción de hidrogeles, geles con DNA, fibras y gelatinas. Los grupos epóxidos son altamente reactivos, facilitando el entrecruzamiento con diversos compuestos<sup>156</sup>. Se ha reportado ampliamente el uso de compuestos de la familia de los poliepóxidos, como EGDGE, PEGDGE, PEG, etc., en aplicaciones biomédicas<sup>157</sup> porque no son citotóxicos<sup>154,158</sup>. En evaluaciones de compuestos como PEGDGE se determinó que su uso con queratinocitos y fibroblastos incrementó la viabilidad, disminuyó la disrupción de la membrana y los niveles de estrés oxidativo. Sin embargo, se ha determinado que utilizar concentraciones mayores a  $4 \times 10^4 \mu\text{g}$  en ratones genera daños irreversibles<sup>159</sup>. En evaluaciones de PEG para la formación de hidrogeles para cultivo celular, se determinó que son adecuados para crear un soporte óptimo para cultivos celulares en 2D y 3D<sup>160</sup>. Por lo tanto, EGDGE es un mejor candidato para trabajar con cultivos celulares.

Adicionalmente, en la elaboración de hidrogeles con entrecruzadores, se ha determinado que las condiciones del medio (T, pH, composición) controlan el grado de entrecruzamiento y la estabilidad del compuesto<sup>157</sup>. Por ejemplo, en evaluaciones de hidrogeles con diglicidil éter se determinó que la capacidad de hinchamiento y el tamaño de poro, disminuyen con el aumento en el grado de entrecruzamiento y con el aumento de la fuerza iónica del medio en el que se encuentra, debido a la disminución de la presión osmótica. En este sentido, cuando se encuentran en soluciones fisiológicas se observa un aumento en la rigidez, sin embargo, reportan hidrólisis en hidrogeles de ácido hialurónico/diglicidil éter después de la incubación por tres semanas en medio de cultivo como DMEM y la degradación disminuye con el incremento en el grado de entrecruzamiento. Adicionalmente, la cantidad de agua absorbida es menor con el incremento en la concentración de NaCl, teniendo menor efecto en hidrogeles con menor grado de entrecruzamiento<sup>158</sup>. Debido a la presencia de grupos carboxílicos en la estructura, la capacidad de absorción incrementa con el aumento del pH del medio<sup>158,160</sup>. De acuerdo con estos factores, es posible que los entrecruzadores presenten un mejor rendimiento en medios de cultivo en comparación con las evaluaciones realizadas en buffer de fosfatos.

Finalmente, de acuerdo con la comparación de sistemas similares (Tabla 11), nuestro biosensor presenta un rango lineal adecuado y una sensibilidad similar; sin embargo, presenta mayores LOD y

LOQ. Por otro lado, se ha reportado el uso de PGE en muestras biológicas, pero no hemos encontrado reportes en medio de cultivo celular. No obstante, como se mencionó anteriormente, consideramos que es importante trabajar en la estabilidad del sistema para poder realizar evaluaciones en tiempo real en contacto directo con las células.

Tabla 11. Comparación de los parámetros de rendimiento de biosensores para detección de glucosa basados en GOx.

Composición	Electrodo	LOD (mM)	LOQ (mM)	Rango lineal (mM)	Sensibilidad $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	Matriz	Ref.
CB-PB-TEMPO-CNCs-GOx	SPE	0.0040	0.015	0.1–2	5.70	DMEM*/PB 1:4	17
m-PPD-pHEMA-GOx	Pt	0.0076	-	-	-	MEBM*	35
CNT-GR-GOx	GCE	0.0029	0.009	3–14	0.43	DMEM	56
Grafeno-MWCNT/GOx/nafion	PGE	0.0149	-	0–39	35.2	PB	106
GO-GOx	PGE	0.0006	-	0.04–0.6	278.4	PB	161
ZnS-CdS-Quitosano-GOx	PGE	0.0030	-	0.01–1	11.5	BRBS*/KCl	162
OsBPEI-GOx-GA		1.4900	4.970	0–7.5	3.10		
OsBPEI-GOx-EGDGE	PGE	0.5000	1.670	0–10	4.69	RPMI	This work

## 5.2 Conclusiones

De acuerdo con el objetivo VII, en este proyecto se demostró que el carbono es un material adecuado para inmovilizar hidrogeles OsBPEI/GOx/GA y OsBPEI/GOx/EGDGE y detectar glucosa en medios de cultivo celular. Adicionalmente, el uso de puntillas de carbono es una alternativa simple y de bajo costo para integrar electrodos de carbono en chips microfluídicos. La integración de los PGE modificados en los chips microfluídicos no dañó el depósito del hidrogel y permitió realizar las evaluaciones.

Con respecto al objetivo VI, se observó que los hidrogeles basados en GA presentaron un mejor desempeño en el buffer de fosfatos; sin embargo, la composición con EGDGE tuvo una mejor respuesta en el medio RPMI 1640 con 5 % de SFB. Siendo este el mejor candidato para su futura integración en sistemas de cultivo celular.

Finalmente, podemos afirmar de acuerdo con la hipótesis planteada, que los biosensores electroquímicos de segunda generación presentaron mejores parámetros en el monitoreo de glucosa en medios de cultivo celular. La respuesta del biosensor enzimático de segunda generación desarrollado en este proyecto presenta parámetros de rendimiento adecuados en comparación con la tecnología que se tiene hasta el momento. Sin embargo, es necesario trabajar en la estabilidad del biosensor para que pueda utilizarse por periodos prolongados en plataformas de cultivo celular.

# CAPÍTULO VI

## REFERENCIAS

## Capítulo VI – Referencias

### 6. Referencias

1. McGonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol.* 2014;87(1):162-171. doi:10.1016/j.bcp.2013.08.006
2. Akhtar A. The Flaws and Human Harms of Animal Experimentation. *Cambridge Q Healthc Ethics.* 2015;24(4):407-419. doi:10.1017/S0963180115000079
3. Storey J, Gobbetti T, Olzinski A, Berridge BR. A Structured Approach to Optimizing Animal Model Selection for Human Translation: The Animal Model Quality Assessment. *ILAR J.* 2021;62(1-2):66-76. doi:10.1093/ilar/ilac004
4. Bavli D, Prill S, Ezra E, et al. Real-time monitoring of metabolic function in liver-onchip microdevices tracks the dynamics of Mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(16):E2231-E2240. doi:10.1073/pnas.1522556113
5. Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov.* 2017;22(5):456-472. doi:10.1177/1087057117696795
6. Vanapalli SA, Duits MHG, Mugele F. Microfluidics as a functional tool for cell mechanics. *Biomicrofluidics.* 2009;3(1). doi:10.1063/1.3067820
7. Shveid Gerson D, Gerson-Cwilich R, Lara Torres CO, et al. Establishment of triple-negative breast cancer cells based on BMI: A novel model in the correlation between obesity and breast cancer. *Front Oncol.* 2022;12(December):1-21. doi:10.3389/fonc.2022.988968
8. Chávarri-Guerra Y, Villarreal-Garza C, Liedke PER, et al. Breast cancer in Mexico: A growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol.* 2012;13(8):e335-e343. doi:10.1016/S1470-2045(12)70246-2
9. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Cáncer de mama en México: Una prioridad apremiante. *Salud Publica Mex.* 2014;51(SUPPL.2). doi:10.1590/S0036-36342009000800026
10. Maffuz-Aziz A, Labastida-Almendaro S, Espejo-Fonseca A, Rodriguez-Cuevas S. Clinical and pathological features of breast cancer in a population of Mexico. *Cirugía y Cir (English Ed.* 2017;85(3):201-207. doi:10.1016/j.circen.2017.05.010
11. Aung A, Kumar V, Theprungsirikul J, Davey SK, Varghese S. An Engineered Tumor-on-a-Chip Device with Breast Cancer–Immune Cell Interactions for Assessing T-cell Recruitment. *Cancer Res.* 2019;80(2):263-275. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0342
12. Chen Y, Gao D, Wang Y, Lin S, Jiang Y. A novel 3D breast-cancer-on-chip platform for therapeutic evaluation of drug delivery systems. *Anal Chim Acta.* 2018;1036:97-106. doi:10.1016/j.aca.2018.06.038
13. Tsao YS, Cardoso AG, Condon RGG, et al. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *J Biotechnol.* 2005;118(3):316-327. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.05.016

14. Krstić N, Jüttner J, Giegerich L, et al. 3D printed biosensor for continuous glucose measurement in cell cultures. *Ann 3D Print Med.* 2023;10. doi:10.1016/j.stlm.2023.100111
15. Peng Z, Xie X, Tan Q, et al. Blood glucose sensors and recent advances: A review. *J Innov Opt Health Sci.* 2022;15(2). doi:10.1142/S1793545822300038
16. Zhang S, Staples AE. Microfluidic-based systems for the management of diabetes. *Drug Deliv Transl Res.* 2024;13-17. doi:10.1007/s13346-024-01569-y
17. Tang Y, Petropoulos K, Kurth F, et al. Screen-Printed Glucose Sensors Modified with Cellulose Nanocrystals (CNCs) for Cell Culture Monitoring. *Biosensors.* 2020;10(9). doi:10.3390/bios10090125
18. Pontius K, Semenova D, Silina YE, Gernaey K V., Junicke H. Automated Electrochemical Glucose Biosensor Platform as an Efficient Tool Toward On-Line Fermentation Monitoring: Novel Application Approaches and Insights. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(May):1-15. doi:10.3389/fbioe.2020.00436
19. Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M. Glucose transporter in cancer metabolism. *Physiol Behav.* 2012;176(10):139-148. doi:10.1097/CCO.0b013e328356da72.Glucose
20. Liberti M V, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3):211. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001.The
21. Goldrick S, Lee K, Spencer C, et al. On-Line Control of Glucose Concentration in High-Yielding Mammalian Cell Cultures Enabled Through Oxygen Transfer Rate Measurements. *Biotechnol J.* 2018;13(4). doi:10.1002/biot.201700607
22. Lederle M, Tric M, Roth T, et al. Continuous optical in-line glucose monitoring and control in CHO cultures contributes to enhanced metabolic efficiency while maintaining darbepoetin alfa product quality. *Biotechnol J.* 2021;16(8):1-11. doi:10.1002/biot.202100088
23. Hwa KY, Subramani B. Synthesis of zinc oxide nanoparticles on graphene-carbon nanotube hybrid for glucose biosensor applications. *Biosens Bioelectron.* 2014;62:127-133. doi:10.1016/j.bios.2014.06.023
24. Li J, Liu Y, Zhu L, et al. Continuous glucose metabolism monitoring platform for long-term analysis of tumor cell proliferation and drug response. *J Electroanal Chem.* 2023;948(July):117808. doi:10.1016/j.jelechem.2023.117808
25. Aldoss A, Lambarte R, Alsalleeh F. High-Glucose Media Reduced the Viability and Induced Differential Pro-Inflammatory Cytokines in Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *Biomolecules.* 2023;13(4). doi:10.3390/biom13040690
26. Harper A, Anderson MR. Electrochemical glucose sensors-developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction. *Sensors.* 2010;10(9):8248-8274. doi:10.3390/s100908248
27. Modena MM, Chawla K, Misun PM, Hierlemann A. Smart Cell Culture Systems: Integration of Sensors and Actuators into Microphysiological Systems. *ACS Chem Biol.* 2018;13(7):1767-1784. doi:10.1021/acscchembio.7b01029
28. Kieninger J, Weltin A, Flamm H, Urban GA. Microsensor systems for cell metabolism-from 2D culture to organ-on-chip. *Lab Chip.* 2018;18(9):1274-1291. doi:10.1039/c7lc00942a

29. Miao Y, Chia LS, Goh NK, Tan SN. Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan matrix cross-linked with glutaraldehyde. *Electroanalysis*. 2001;13(4):347-349. doi:10.1002/1521-4109(200103)13:4<347::AID-ELAN347>3.0.CO;2-Z
30. Lee J, Maji S, Lee H. Fabrication and Integration of a Low-cost 3D Printing-based Glucose Biosensor for Bioprinted Liver-on-a-chip. 2023;(18):1-13.
31. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different. *Arch Med Sci*. 2016;14(4):910-919.
32. Luka G, Ahmadi A, Najjaran H, et al. Microfluidics integrated biosensors: A leading technology towards lab-on-A-chip and sensing applications. *Sensors (Switzerland)*. 2015;15(12):30011-30031. doi:10.3390/s151229783
33. Kulkarni MB, Ayachit NH, Aminabhavi TM. Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. *Biosensors*. 2022;12(7). doi:10.3390/bios12070543
34. Malhotra BD, Ali MA. Chapter 9 - Microfluidic Biosensor. In: Malhotra BD, Ali MABT-N for B, eds. *Micro and Nano Technologies*. William Andrew Publishing; 2018:263-293. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00009-1
35. Dornhof J, Kieninger J, Muralidharan H, Maurer J, Urban GA, Weltin A. Microfluidic organ-on-chip system for multi-analyte monitoring of metabolites in 3D cell cultures. *Lab Chip*. 2022;22(2):225-239. doi:10.1039/d1lc00689d
36. Duval K, Grover H, Han LH, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017;32(4):266-277. doi:10.1152/physiol.00036.2016
37. Sun M, Liu A, Yang X, et al. 3D Cell Culture—Can It Be As Popular as 2D Cell Culture? *Adv NanoBiomed Res*. 2021;1(5). doi:10.1002/anbr.202000066
38. Cardoso BD, Castanheira EMS, Lanceros-Méndez S, Cardoso VF. Recent Advances on Cell Culture Platforms for In Vitro Drug Screening and Cell Therapies: From Conventional to Microfluidic Strategies. *Adv Healthc Mater*. 2023;2202936:1-30. doi:10.1002/adhm.202202936
39. Krstic N, Jüttner J, Müller A, Knuth M, Thielemann C. 3D printed hydrogel glucose sensor on argon plasma activated polystyrene. *Lek a Tech*. 2020;50(2):45-48. doi:10.14311/CTJ.2020.2.01
40. Ferrari E, Palma C, Vesentini S, Occhetta P, Rasponi M. Integrating Biosensors in Organs-on-Chip Devices: A Perspective on Current Strategies to Monitor Microphysiological Systems. *Biosensors*. 2020;10(9). doi:10.3390/bios10090110
41. Adam Kratz SR, Höll G, Schuller P, Ertl P, Rothbauer M. Latest trends in biosensing for microphysiological organs-on-a-chip and body-on-a-chip systems. *Biosensors*. 2019;9(3). doi:10.3390/bios9030110
42. Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(2):65-81. doi:10.1038/s41568-018-0104-6
43. ThermoFisher S. 3D cell culture handbook. *3D Cell Cult Handb*. 2020:124. thermofisher.com/3dculture%0AFor.
44. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*. 2014;32(8):760-772. doi:10.1038/nbt.2989

45. Ben-Yoav H, Dykstra PH, Bentley WE, Ghodssi R. A microfluidic-based electrochemical biochip for label-free diffusion-restricted DNA hybridization analysis. *Biosens Bioelectron.* 2012;38(1):114-120. doi:10.1016/j.bios.2012.05.009
46. Ahn CH, Choi J-W, Beaucage G, et al. Disposable Smart Lab on a Chip for Point-of-Care Clinical Diagnostics. 2004;92(1). doi:10.1109/JPROC.2003.820548
47. BARANSKA P, JERCZYNSKA H, PAWLOWSKA Z, KOZIOLKIEWICZ W, CIERNIEWSKI CS. Expression of Integrins and Adhesive Properties of Human Endothelial Cell Line EA.hy 926. 2005;(October 2015). <https://www.researchgate.net/publication/279439250%0AExpression>.
48. Targosz-Korecka M, Brzezinka G, Malek K, Stepień E, Szymonski M. Stiffness memory of EA . hy926 endothelial cells in response to chronic hyperglycemia. 2013:1-7. doi:10.1186/1475-2840-12-96
49. Taciak B, Białasek M, Braniewska A, et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One.* 2018;13(6):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0198943
50. Bowdish D, Fan J. *Propagation & Culturing of Raw 264.7 Cells.*; 2016. [www.bowdish.ca](http://www.bowdish.ca).
51. Eckener S. *Raw264.7.* Vol 49.; 2016. [www.clsgeb.de](http://www.clsgeb.de).
52. Camarillo IG, Xiao F, Madhivanan S, et al. *Low and High Voltage Electrochemotherapy for Breast Cancer: An in Vitro Model Study.*; 2018. doi:10.1533/9781908818294.55
53. González A. Efectos sensibilizadores de la melatonina a la quimioterapia y a la radioterapia en el cáncer de mama: acciones antiangiogénicas y adipogénicas. *Angew Chemie Int Ed* 6(11), 951–952. 2019.
54. Oh M, Batty S, Banerjee N, Kim TH. High extracellular glucose promotes cell motility by modulating cell deformability and contractility via the cAMP-RhoA-ROCK axis in human breast cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2023;34(8):1-15. doi:10.1091/mbc.E22-12-0560
55. Ma Z, Luo Y, Zhu Q, et al. In-situ monitoring of glucose metabolism in cancer cell microenvironments based on hollow fiber structure. *Biosens Bioelectron.* 2020;162(1378):112261. doi:10.1016/j.bios.2020.112261
56. Madhurantakam S, Babu JK, Balagruru Rayappan JB, Maheswari Krishnan U. Fabrication of mediator-free hybrid nano-interfaced electrochemical biosensor for monitoring cancer cell proliferation. *Biosens Bioelectron.* 2017:832-841. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.039
57. Zhu Y, Mandal K, Hernandez AL, et al. State of the art in integrated biosensors for organ-on-a-chip applications. *Biomed Eng (NY).* 2021. doi:https://doi.org/10.1016/j.cobme.2021.100309
58. Santbergen MJC, van der Zande M, Bouwmeester H, Nielen MWF. Online and in situ analysis of organs-on-a-chip. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;115:138-146. doi:10.1016/j.trac.2019.04.006
59. Navarro-Nateras L, Diaz-Gonzalez J, Aguas-Chantes D, et al. Development of a Redox-Polymer-Based Electrochemical Glucose Biosensor Suitable for Integration in Microfluidic 3D Cell Culture Systems. *Biosensors.* 2023;13(6):582. doi:10.3390/bios13060582
60. Liu M, Yang M, Wang M, Wang H, Cheng J. A Flexible Dual-Analyte Electrochemical Biosensor for Salivary Glucose and Lactate Detection. *Biosensors.* 2022;12(4):1-11. doi:10.3390/bios12040210

61. Fiorello ML, Treweeke AT, Macfarlane DP, Megson IL. The impact of glucose exposure on bioenergetics and function in a cultured endothelial cell model and the implications for cardiovascular health in diabetes. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-12. doi:10.1038/s41598-020-76505-4
62. Misun PM, Rothe J, Schmid YRF, Hierlemann A, Frey O. Multi-analyte biosensor interface for real-time monitoring of 3D microtissue spheroids in hanging-drop networks. *Microsystems Nanoeng.* 2016;2(March). doi:10.1038/micronano.2016.22
63. Timmins N, Dietmair S, Nielsen L. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis.* 2004;7(2):97-103. doi:10.1007/s10456-004-8911-7
64. Wei F, Wang S, Gou X. A review for cell-based screening methods in drug discovery. *Biophys Reports.* 2021;7(6):504-516. doi:10.52601/bpr.2021.210042
65. Xue Y, Thalmayer AS, Zeising S, Fischer G, Lübke M. *Commercial and Scientific Solutions for Blood Glucose Monitoring—A Review.* Vol 22.; 2022. doi:10.3390/s22020425
66. Theuer L, Randek J, Junne S, Neubauer P, Mandenius CF, Beni V. Single-use printed biosensor for l-lactate and its application in bioprocess monitoring. *Processes.* 2020;8(3). doi:10.3390/pr8030321
67. Leger C, Bertrand P. Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies. 2015;(March). doi:10.1021/cr0680742
68. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications.* Vol 677.; 2001. <http://elib.tu-darmstadt.de/tocs/95069577.pdf>.
69. Wang J. *ANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY.* 3rd ed. (Sons JW and, ed.). New Jersey; 2006.
70. Brotons A. Aproximación a La Determinación Electroquímica Del Grado De Metilación Del Adn. 2015. [www.iuma.ulpgc.es](http://www.iuma.ulpgc.es).
71. Princeton Applied Research. A Review of Techniques for Electrochemical Analysis. *Anal Chem.* 1976;48(2):129A-129A. doi:10.1021/ac60366a732
72. Saidur MR, Aziz ARA, Basirun WJ. Recent advances in DNA-based electrochemical biosensors for heavy metal ion detection: A review. *Biosens Bioelectron.* 2017;90(September 2016):125-139. doi:10.1016/j.bios.2016.11.039
73. Andryukov BG, Besednova NN, Romashko R V., Zaporozhets TS, Efimov TA. Label-free biosensors for laboratory-based diagnostics of infections: Current achievements and new trends. *Biosensors.* 2020;10(2). doi:10.3390/bios10020011
74. Ortega F. Biosensores Y Biochips: Herramientas para el Diagnóstico y la Terapéutica. In: Madrid, España; 2006.
75. Moyano A. Separación Y Detección De Escherichia Coli Mediante Marcaje Inmuno-Magnético. 2015. [https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32483/TFM\\_AmandaMoyano.pdf?sequence=3](https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32483/TFM_AmandaMoyano.pdf?sequence=3).
76. Sheingold HD. *Transducer\_ Interfacing\_ handbook.*; 1980.
77. Mejía ZE. Desarrollo de un biosensor electroquímico para detectar lactato en productos lácteos. 2010. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/424/61074s.pdf?sequence>

e=1&isAllowed=y.

78. Arris FA, Benoudjit AM, Sanober F, Wan Salim WWA. Characterization of electrochemical transducers for biosensor applications. *Multifaceted Protoc Biotechnol.* 2019;119-137. doi:10.1007/978-981-13-2257-0\_11
79. Thvenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical Report). *Pure Appl Chem.* 1999;71(12):2333-2348. doi:10.1351/pac199971122333
80. Davis F, Higson SPJ. *Biosensors for DNA and RNA Detection and Characterization.* Elsevier Masson SAS.; 2012. doi:10.1533/9780857097187.2.163
81. Navaee A, Salimi A. *Enzyme-Based Electrochemical Biosensors.* Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-816491-4.00007-3
82. House JL, Anderson EM, Ward WK. Immobilization techniques to avoid enzyme loss from oxidase-based biosensors: A one-year study. *J Diabetes Sci Technol.* 2007;1(1):18-27. doi:10.1177/193229680700100104
83. Heller A, Feldman B. Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chem Rev.* 2008;108(7):2482-2505. doi:10.1021/cr068069y
84. Battaglini F, Bartlett PN, Wang JH. Covalent attachment of osmium complexes to glucose oxidase and the application off the resulting modified enzyme in an enzyme switch responsive to glucose. *Anal Chem.* 2000;72(3):502-509. doi:10.1021/ac990321x
85. Osadebe I, Conghaile P, Kavanagh P, Leech D. Glucose oxidation by osmium redox polymer mediated enzyme electrodes operating at low potential and in oxygen, for application to enzymatic fuel cells. *Electrochim Acta.* 2015;182:320-326. doi:10.1016/j.electacta.2015.09.088
86. Jayakumar K, Bennett R, Leech D. Electrochemical glucose biosensor based on an osmium redox polymer and glucose oxidase grafted to carbon nanotubes: A design-of-experiments optimisation of current density and stability. *Electrochim Acta.* 2021;371:137845. doi:10.1016/j.electacta.2021.137845
87. Juska VB, Pemble ME. A dual-enzyme, micro-band array biosensor based on the electrodeposition of carbon nanotubes embedded in chitosan and nanostructured Au-foams on microfabricated gold band electrodes. *Analyst.* 2020;145(2):402-414. doi:10.1039/c9an01664c
88. Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S, et al. Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors (Switzerland).* 2016;16(6). doi:10.3390/s16060780
89. Zhu Z, Garcia-Gancedo L, J. Flewitt A, Xie H, Moussy F, I. Milne W. A Critical Review of Glucose Biosensors Based on Carbon Nanomaterials: Carbon Nanotubes and Graphene. 2012. doi:10.3390/s120505996
90. Díaz-González J carlo M, Escalona-Villalpando RA, Arriaga LG, Minter SD, Casanova-Moreno JR. Effects of the cross-linker on the performance and stability of enzymatic electrocatalytic films of glucose oxidase and dimethylferrocene-modified linear poly(ethyleneimine). *Electrochim Acta.* 2020;337. doi:10.1016/j.electacta.2020.135782
91. Casanova-Moreno J, Arjona N, Cercado B. Bioelectrocatalysis for biofuel cells. In: *Biofuel Cells:*

*Materials and Challenges (in Press)*. Wiley-Scrivener; 2020:1-17.

92. Díaz JC. Desarrollo y fabricación de un biosensor electroquímico para mediciones de glucosa en plataformas microfluídicas. 2019.
93. Coria L, Battaglini F, Wirth S. Biocátodos basados en ensamblados de polielectrolitos electroactivos con lacasas. 2021.
94. Gstraunthaler, Gerhard, Lindl T. Composition of FBS. *Zell- und Gewebekultur*. 2002;2. [http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Forschung/FBS.pdf%0Afile:///D:/Users/Ludmilla/Documents/FBS componets.pdf](http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Forschung/FBS.pdf%0Afile:///D:/Users/Ludmilla/Documents/FBS%20componets.pdf).
95. Vasylieva N, Marinesco S. Enzyme immobilization on microelectrode biosensors. In: *Neuromethods*. Vol 80. ; 2013:95-114. doi:10.1007/978-1-62703-370-1\_5
96. Foucher C, Tubben R. Lactic acidosis. *West J Med*. 2022;133(5):418-424.
97. Desideri G, Castaldo G, Lombardi A, et al. Is it time to revise the normal range of serum uric acid levels? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(9):1295-1306.
98. Travica N, Ried K, Sali A, Hudson I, Scholey A, Pipingas A. Plasma Vitamin C concentrations and cognitive function: A cross-sectional study. *Front Aging Neurosci*. 2019;11(APR):1-21. doi:10.3389/fnagi.2019.00072
99. Yoo EH, Lee SY. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors*. 2010;10(5):4558-4576. doi:10.3390/s100504558
100. Reanpang P, Mool-am-kha P, Upan J, Jakmunee J. A novel flow injection amperometric sensor based on carbon black and graphene oxide modified screen-printed carbon electrode for highly sensitive determination of uric acid. *Talanta*. 2021;232(April):122493. doi:10.1016/j.talanta.2021.122493
101. Masrat S, Nagal V, Khan M, et al. Electrochemical Ultrasensitive Sensing of Uric Acid on Non-Enzymatic Porous Cobalt Oxide Nanosheets-Based Sensor. *Biosensors*. 2022;12(12). doi:10.3390/bios12121140
102. Zhang L, Feng J, Chou KC, Su L, Hou X. Simultaneously electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid using glassy carbon electrode modified with chrysanthemum-like titanium nitride. *J Electroanal Chem*. 2017;803(June):11-18. doi:10.1016/j.jelechem.2017.09.006
103. Michalkiewicz S, Skorupa A, Jakubczyk M. Carbon materials in electroanalysis of preservatives: A review. *Materials (Basel)*. 2021;14(24). doi:10.3390/ma14247630
104. Witkowska-Nery E, Kundys-Siedlecka M, Furuya Y, Jönsson-Niedziółka M. Pencil lead as a material for microfluidic 3D-electrode assemblies. *Sensors (Switzerland)*. 2018;18(11). doi:10.3390/s18114037
105. David IG, Popa DE, Buleandra M. Pencil graphite electrodes: A versatile tool in electroanalysis. *J Anal Methods Chem*. 2017;2017(Cv). doi:10.1155/2017/1905968
106. Torrinha Á, Montenegro MCBSM, Araújo AN. Microfluidic Platform with an Embedded Pencil Graphite Electrode Biosensor for the Detection of Glucose and Cadmium. *J Electrochem Soc*. 2019;166(2):B155-B160. doi:10.1149/2.1221902jes
107. Campos Tavares PH, Sanches Barbeira PJ. Influence of pencil lead hardness on voltammetric

- response of graphite reinforcement carbon electrodes. *J Appl Electrochem.* 2008;38(6):827-832. doi:10.1007/s10800-008-9518-2
108. Islam J, Shao H, Badal MR, Razeeb KM, Jamalid M. Pencil graphite as electrode platform for free chlorine sensors and energy storage devices. *PLoS One.* 2021;16(3 March):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0248142
  109. Senel M, Alachkar A. Lab-in-a-pencil graphite: A 3D-printed microfluidic sensing platform for real-time measurement of antipsychotic clozapine level. *Lab Chip.* 2021;21(2):405-411. doi:10.1039/d0lc00970a
  110. Fernández-Rivas D. Microfluidos : ¿cuánto hay de nuevo? 2008;25(2):142-149.
  111. Convery N, Gadegaard N. 30 Years of Microfluidics. *Micro Nano Eng.* 2019;2(January):76-91. doi:10.1016/j.mne.2019.01.003
  112. Nguyen N-T, Wereley ST. *Fundamentals and Applications of Microfluidics.* Vol 110.; 2006.
  113. Mogensen KB, Kutter JP. Optical detection in microfluidic systems. *Electrophoresis.* 2009;30(SUPPL. 1):92-100. doi:10.1002/elps.200900101
  114. Gai H, Li Y, Yeung ES. Optical Detection Systems on Microfluidic Chips. *Pept Mater.* 2011;310(June 2011):1-26. doi:10.1007/128
  115. Bao N, Wang J, Lu C. Recent advances in electric analysis of cells in microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem.* 2008;391(3):933-942. doi:10.1007/s00216-008-1899-x
  116. Gimondi S, Ferreira H, Reis RL, Neves NM. Microfluidic Devices: A Tool for Nanoparticle Synthesis and Performance Evaluation. *ACS Nano.* 2023;17(15):14205-14228. doi:10.1021/acsnano.3c01117
  117. Tehranirokh M, Kouzani AZ, Francis PS, Kanwar JR. Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. *Biomicrofluidics.* 2013;7(5). doi:10.1063/1.4826935
  118. Coluccio ML, Perozziello G, Malara N, et al. Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectron Eng.* 2019;208:14-28. doi:10.1016/j.mee.2019.01.004
  119. Singh D, Mathur A, Arora S, Roy S, Mahindroo N. Journey of organ on a chip technology and its role in future healthcare scenario. *Appl Surf Sci Adv.* 2022;9(March):100246. doi:10.1016/j.apsadv.2022.100246
  120. Syahrudin MH, Anggraeni R, Ana ID, Ana ID. A microfluidic organ-on-a-chip: into the next decade of bone tissue engineering applied in dentistry. *Futur Sci OA.* 2023;9(10). doi:10.2144/fsoa-2023-0061
  121. Srivastava SK, Foo GW, Aggarwal N, Chang MW. Organ-on-chip technology: Opportunities and challenges. *Biotechnol Notes.* 2024;5(December 2023):8-12. doi:10.1016/j.biotno.2024.01.001
  122. Fallahi H, Zhang J, Phan HP, Nguyen NT. Flexible microfluidics: Fundamentals, recent developments, and applications. *Micromachines.* 2019;10(12). doi:10.3390/mi10120830
  123. Walsh DI, Kong DS, Murthy SK, Carr PA. Enabling Microfluidics: from Clean Rooms to Makerspaces. *Trends Biotechnol.* 2017;35(5):383-392. doi:10.1016/j.tibtech.2017.01.001
  124. Wong I, Ho CM. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluid Nanofluidics.* 2009;7(3):291-306. doi:10.1007/s10404-009-

0443-4

125. Gökaltun A, Kang YB (Abraham), Yarmush ML, Usta OB, Asatekin A. Simple Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) via Surface Segregating Smart Polymers for Biomicrofluidics. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-019-43625-5
126. Kovach KM, Capadona JR, Gupta A Sen, Potkay JA. The effects of PEG-based surface modification of PDMS microchannels on long-term hemocompatibility. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(12):4195-4205. doi:10.1002/jbm.a.35090
127. Gomez-Sjoberg R, Leyrat AA, Houseman BT, Shokat K, Quake SR. Biocompatibility and Reduced Drug Absorption of Sol-Gel-Treated Poly(dimethyl siloxane) for Microfluidic Cell Culture Applications.pdf. *Anal Chem.* 2010;82:8954-8960. doi:10.1021/ac101870s
128. Bodas D, Rauch JY, Khan-Malek C. Surface modification and aging studies of addition-curing silicone rubbers by oxygen plasma. *Eur Polym J.* 2008;44(7):2130-2139. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.04.012
129. Deguchi S, Hotta J, Yokoyama S, Matsui TS. Viscoelastic and optical properties of four different PDMS polymers. *J Micromechanics Microengineering.* 2015;25(9). doi:10.1088/0960-1317/25/9/097002
130. Gong X, Wen W. Polydimethylsiloxane-based conducting composites and their applications in microfluidic chip fabrication. *Biomicrofluidics.* 2009;3(1). doi:10.1063/1.3098963
131. Li W, Chen T, Chen Z, et al. Squeeze-chip: A finger-controlled microfluidic flow network device and its application to biochemical assays. *Lab Chip.* 2012;12(9):1587-1590. doi:10.1039/c2lc40125h
132. Miranda I, Souza A, Sousa P, et al. Properties and applications of PDMS for biomedical engineering: A review. *J Funct Biomater.* 2022;13(1). doi:10.3390/jfb13010002
133. McDonald JC, Whitesides GM. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc Chem Res.* 2002;35(7):491-499. doi:10.1021/ar010110q
134. Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, Whitesides GM. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem.* 1998;70(23):4974-4984. doi:10.1021/ac980656z
135. Weibel DB, DiLuzio WR, Whitesides GM. Microfabrication meets microbiology. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(3):209-218. doi:10.1038/nrmicro1616
136. Dongqing L. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics.* Vol 53. Springer; 2008. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
137. Chakraborty S. *Microfluidics and Microfabrication.* India: Springer; 2010. doi:10.1007/978-1-4419-1543-6
138. Azouz AB, Vázquez M, Brabazon D. 13.17 - Developments of Laser Fabrication Methods for Lab-on-a-Chip Microfluidic Multisensing Devices. In: Hashmi S, Batalha GF, Van Tyne CJ, Yilbas BBT-CMP, eds. Oxford: Elsevier; 2014:447-458. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096532-1.01317-0
139. Mallikarjuna B, Bhargav P, Hiremath S, Jayachristiyan KG, Jayanth N. A review on the melt extrusion-based fused deposition modeling (FDM): background, materials, process parameters and military applications. *Int J Interact Des Manuf.* 2023. doi:10.1007/s12008-023-01354-0
140. Mwema FM, Akinlabi ET. *Basics of Fused Deposition Modelling (FDM) BT - Fused Deposition*

- Modeling: Strategies for Quality Enhancement.*; 2020. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-48259-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48259-6_1).
141. Iftekar SF, Aabid A, Amir A, Baig M. Advancements and Limitations in 3D Printing Materials and Technologies: A Critical Review. *Polymers (Basel)*. 2023;15(11). doi:10.3390/polym15112519
  142. Sandanamsamy L, Harun WSW, Ishak I, et al. A comprehensive review on fused deposition modelling of polylactic acid. *Prog Addit Manuf*. 2023;8(5):775-799. doi:10.1007/s40964-022-00356-w
  143. Elkaseer A, Chen KJ, Janhsen JC, Refle O, Hagenmeyer V, Scholz SG. Material jetting for advanced applications: A state-of-the-art review, gaps and future directions. *Addit Manuf*. 2022;60(PA):103270. doi:10.1016/j.addma.2022.103270
  144. Sochol RD, Sweet E, Glick CC, et al. 3D printed microfluidic circuitry via multijet-based additive manufacturing. *Lab Chip*. 2016;16(4):668-678. doi:10.1039/c5lc01389e
  145. Pagac M, Hajnys J, Ma QP, et al. A review of vat photopolymerization technology: Materials, applications, challenges, and future trends of 3d printing. *Polymers (Basel)*. 2021;13(4):1-20. doi:10.3390/polym13040598
  146. Al Rashid A, Ahmed W, Khalid MY, Koç M. Vat photopolymerization of polymers and polymer composites: Processes and applications. *Addit Manuf*. 2021;47(August):102279. doi:10.1016/j.addma.2021.102279
  147. Bhattacharjee N, Urrios A, Kang S, Folch A. The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics. *Lab Chip*. 2016;16(10):1720-1742. doi:10.1039/c6lc00163g
  148. O'Neill PF, Ben Azouz A, Vázquez M, et al. Advances in three-dimensional rapid prototyping of microfluidic devices for biological applications. *Biomicrofluidics*. 2014;8(5). doi:10.1063/1.4898632
  149. Caliarì SR, Burdick JA, Terms BOXKEY. REVIEW A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Publ Gr*. 2016;13(5):405-414. doi:10.1038/nmeth.3839
  150. Wan HY, Chen JCH, Xiao Q, et al. Stabilization and improved functionality of three-dimensional perfusable microvascular networks in microfluidic devices under macromolecular crowding. *Biomater Res*. 2023;27(1):1-16. doi:10.1186/s40824-023-00375-w
  151. Olea AR, Jurado A, Slor G, et al. Reaching the Tumor: Mobility of Polymeric Micelles Inside an In Vitro Tumor-on-a-Chip Model with Dual ECM. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2023;15(51):59134-59144. doi:10.1021/acsami.3c12798
  152. Wang Y, Toh YC, Li Q, et al. Mechanical compaction directly modulates the dynamics of bile canaliculi formation. *Integr Biol (United Kingdom)*. 2013;5(2):390-401. doi:10.1039/c2ib20229h
  153. Satar R, Jafri MA, Rasool M, Ansari SA. Role of glutaraldehyde in imparting stability to immobilized  $\beta$ -galactosidase systems. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2017;60(December):1-12. doi:10.1590/1678-4324-2017160311
  154. Bratskaya S, Privar Y, Nesterov D, et al. Chitosan Gels and Cryogels Cross-Linked with Diglycidyl Ethers of Ethylene Glycol and Polyethylene Glycol in Acidic Media. *Biomacromolecules*. 2019;20(4):1635-1643. doi:10.1021/acs.biomac.8b01817
  155. Park YT, Park JY, Park K, Choi SS, Yoo YJ. Effect of glutaraldehyde treatment on stability of

- permeabilized ochrobactrum anthropi SY509 in nitrate removal. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(11):1803-1808. doi:10.4014/jmb.0800.094
156. Huang D, Peng Z, Hu Z, et al. A new consolidation system for aged silk fabrics: Effect of reactive epoxide-ethylene glycol diglycidyl ether. *React Funct Polym.* 2013;73(1):168-174. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2012.08.019
157. Vargas G, Acevedo JL, López J, Romero J. Study of cross-linking of gelatin by ethylene glycol diglycidyl ether. *Mater Lett.* 2008;62(21-22):3656-3658. doi:10.1016/j.matlet.2008.04.020
158. La Gatta A, Schiraldi C, Papa A, et al. Hyaluronan scaffolds via diglycidyl ether crosslinking: Toward improvements in composition and performance. *Carbohydr Polym.* 2013;96(2):536-544. doi:10.1016/j.carbpol.2013.04.022
159. Kim DH, Han JH, Kwon HC, et al. Toxicity assessment of a single dose of poly(Ethylene glycol) diglycidyl ether (pegde) administered subcutaneously in mice. *Toxics.* 2021;9(12). doi:10.3390/toxics9120354
160. Kasko AM. Degradable Poly(ethylene glycol) Hydrogels for 2D and 3D Cell Culture. *Mater Matters.* 2011;6(3):1-9. papers3://publication/uuid/8773FB78-E317-4C97-B29B-43B1D9C02F48.
161. Sehat AA, Khodadadi AA, Shemirani F, Mortazavi Y. Fast immobilization of glucose oxidase on graphene oxide for highly sensitive glucose biosensor fabrication. *Int J Electrochem Sci.* 2015;10(1):272-286.
162. Saglam Ö, Kızılkaya B, Uysal H, Dilgin Y. Biosensing of glucose in flow injection analysis system based on glucose oxidase-quantum dot modified pencil graphite electrode. *Talanta.* 2016;147:315-321. doi:10.1016/j.talanta.2015.09.050
163. 11965 - DMEM, high glucose - MX. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/technical-resources/media-formulation.8.html>. Accessed January 18, 2022.
164. ATCC. Formulation for DMEM : F-12 Medium. 2006;2:20108. [www.atcc.org](http://www.atcc.org).
165. Scientific TF. 11875 - RPMI 1640. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/technical-resources/media-formulation.114.html>. Accessed January 23, 2022.

# CAPÍTULO VII

---

## ANEXOS

## Capítulo VII – Anexos

### 7.1 Composición del medio de cultivo D-MEM<sup>163</sup>

Component	MW	mg/L	mM
<b>Amino Acids</b>			
Glycine	75	30	0.4
L-Arginine hydrochloride	211	84	0.39810428
L-Cystine 2HCl	313	63	0.20127796
L-Glutamine	146	584	4
L-Histidine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	210	42	0.2
L-Isoleucine	131	105	0.8015267
L-Leucine	131	105	0.8015267
L-Lysine hydrochloride	183	146	0.7978142
L-Methionine	149	30	0.20134228
L-Phenylalanine	165	66	0.4
L-Serine	105	42	0.4
L-Threonine	119	95	0.79831934
L-Tryptophan	204	16	0.07843138
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261	104	0.39846742
L-Valine	117	94	0.8034188
<b>Vitaminas</b>			
Choline chloride	140	4	0.02857143
D-Calcium pantothenate	477	4	0.00838574
Folic Acid	441	4	0.0090703
Niacinamide	122	4	0.03278688
Pyridoxine hydrochloride	206	4	0.01941748
Riboflavin	376	0.4	0.00106383
Thiamine hydrochloride	337	4	0.01186944
i-Inositol	180	7.2	0.04
<b>Inorganic salts</b>			
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)	111	200	1.8018018
Ferric Nitrate (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)	404	0.1	2.48E-04
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	120	97.67	0.8139166
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.3333335
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	3700	44.04762
Sodium Chloride (NaCl)	58	6400	110.344826
Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	138	125	0.9057971
<b>Other components</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	25
Phenol Red	376.4	15	0.39851222

## 7.2 Composición del medio de cultivo DMEM/F12<sup>164</sup>

Component	g/L
<b>Inorganic Salts</b>	
CaCl <sub>2</sub> (anhydrous)	0.1166
CuSO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.000000
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.0000
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00041
MgSO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.0849
KCl	0.311
NaHCO <sub>3</sub>	1.
NaCl	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.07
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.062
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00043
<b>Amino Acids</b>	
L-Alanine	0.0044
L-Arginine·HCl	0.147
L-Asparagine·H <sub>2</sub> O	0.007
L-Aspartic Acid	0.0066
L-Cystine·HCl·H <sub>2</sub> O	0.0175
L-Cystine·2HCl	0.0312
L-Glutamic Acid	0.0073
L-Glutamine	0.365
Glycine	0.0187
L-Histidine·HCl·H <sub>2</sub> O	0.0314
L-Isoleucine	0.0543
L-Leucine	0.0589
L-Lysine·HCl	0.0913
L-Methionine	0.0172
L-Phenylalanine	0.0354
L-Proline	0.0172
L-Serine	0.0262
L-Threonine	0.0535
L-Tryptophan	0.0090
L-Tyrosine·2Na·2H <sub>2</sub> O	0.0558
L-Valine	0.0528
<b>Vitamins</b>	
D-Biotin	0.0000036
Choline Chloride	0.0089
Folic Acid	0.0026
myo-Inositol	0.0126
Niacinamide	0.0020
D-Pantothenic Acid (hemicalcium	0.0022

<b>Pyridoxine·HCl</b>	0.0020
<b>Riboflavin</b>	0.0002
<b>Thiamine·HCl</b>	0.0021
<b>Vitamin B-12</b>	0.0006
<b>Other</b>	
<b>D-Glucose</b>	3.15
<b>HEPES</b>	3.574
<b>Hypoxanthine</b>	0.0023
<b>Linoleic Acid</b>	0.00004
<b>Phenol Red, Sodium Salt</b>	0.008
<b>Putrescine·2HCl</b>	0.0000
<b>Pyruvic Acid·Na</b>	0.05
<b>DL-Thioctic Acid</b>	0.00010
<b>Thymidine</b>	0.00036

### 7.3 Composición del medio de cultivo RPMI 1640<sup>165</sup>

Component	MW	(mg/L)	mM
<b>Amino Acids</b>			
Glycine	75	10	0.13333334
L-Arginine	174	200	1.1494253
L-Asparagine	132	50	0.37878788
L-Aspartic acid	133	20	0.15037593
L-Cystine 2HCl	313	65	0.20766774
L-Glutamic Acid	147	20	0.13605443
L-Glutamine	146	300	2.0547945
L-Histidine	155	15	0.09677419
L-Hydroxyproline	131	20	0.15267175
L-Isoleucine	131	50	0.3816794
L-Leucine	131	50	0.3816794
L-Lysine hydrochloride	183	40	0.21857923
L-Methionine	149	15	0.10067114
L-Phenylalanine	165	15	0.09090909
L-Proline	115	20	0.17391305
L-Serine	105	30	0.2857143
L-Threonine	119	20	0.16806723
L-Tryptophan	204	5	0.0245098
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261	29	0.11111111
L-Valine	117	20	0.17094018
<b>Vitamins</b>			
Biotin	244	0.2	8.20E-04
Choline chloride	140	3	0.02142857
D-Calcium pantothenate	477	0.25	5.24E-04
Folic Acid	441	1	0.00226757
Niacinamide	122	1	0.00819672
Para-Aminobenzoic Acid	137	1	0.00729927
Pyridoxine hydrochloride	206	1	0.00485437
Riboflavin	376	0.2	5.32E-04
Thiamine hydrochloride	337	1	0.00296736
Vitamin B12	1355	0.005	3.69E-06
i-Inositol	180	35	0.19444445
<b>Inorganic Salts</b>			
Calcium nitrate (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O)	236	100	0.42372882
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	120	48.84	0.407
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.3333335
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	2000	23.809525
Sodium Chloride (NaCl)	58	6000	103.44827
Sodium Phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) anhydrous	142	800	5.633803

<b>Other components</b>			
<b>D-Glucose (Dextrose)</b>	180	2000	11.111111
<b>Glutathione (reduced)</b>	307	1	0.00325733
<b>Phenol Red</b>	376.4	5	0.01328374

## 7.4 Composición del Suero Fetal Bovino<sup>94</sup>

El Suero Fetal Bovino (SFB) es un medio no definido, en los análisis que se han realizado se han encontrado más de 1000 componentes, incluyendo proteínas, electrolitos, lípidos, carbohidratos, hormonas, enzimas, factores de crecimiento y otros componentes no identificados. Algunos componentes principales se muestran a continuación:

Component	Average	Range
Endotoxins (ng/ml)	0.35	0.01 - 10.0
Glucose (mg/ml)	1.25	0.85 - 1.81
Protein (mg/ml)	38	32 - 70
Albumin (mg/ml)	23	20 - 36
Hemoglobine (µg/ml)	113	24 - 181
Bilirubin, total (µg/ml)	4	3 - 11
Bilirubin, direct (µg/ml)	2	0 - 5
Urea (µg/ml)	160	140 - 200
Urate (µg/ml)	29	13 - 41
Creatinin (µg/ml)	31	16 - 43
Insulin (µU/ml)	10	6 - 14
Cortisol (ng/ml)	0.5	0.1 - 23
Growth hormone (ng/ml)	39	18.7 - 51.6
Parathormone, PTH (ng/ml)	1.72	0.085 - 6.18
Triiodothyronine, T3 (ng/ml)	1.2	0.56 - 2.23
Thyroxine, T4 (ng/ml)	0.12	0.08 - 0.16
Thyroid-stimulating hormone, TSH (ng/ml)	1.22	0.2 - 4.5
Follicle-stimulating hormone, FSH (pg/ml)	95	20 - 338
Testosterone (pg/ml)	400	210 - 990
Progesterone, P4 (pg/ml)	80	3 - 360
Prolactin = Luteotropic hormone, LTH (pg/ml)	176	20 - 500
Luteinizing hormone, LH ?? (pg/ml)	8	1,2 - 18
Prostaglandin E (ng/ml)	5.9	0.5 - 30.5
Prostaglandin F (ng/ml)	12.3	3.8 - 42.0
Vitamine A (ng/ml)	90	10 - 350
Vitamine E (ng/ml)	1.1	1 - 4.2
Cholesterol (µg/ml)	310	120 - 630
Lactate-dehydrogenase, LDH (mU/ml)	864	260 - 1,215
Alkaline Phosphatase (mU/ml)	255	110 - 352
Aspartate-Aminotransferase, ASAT (mU/ml)	130	20 - 200
Sodium, Na <sup>+</sup> (µeq/ml)	137	125 - 143
Potassium, K <sup>+</sup> (µeq/ml)	11.2	10.0 - 14.0

<b>Calcium, Ca<sup>2+</sup> (µeq/ml)</b>	6.75	6.30 - 7.15
<b>Chloride, Cl<sup>-</sup> (µeq/ml)</b>	103	98 - 108
<b>Phosphate, Pi (µg/ml)</b>	98	43 - 114
<b>Selen (µg/ml)</b>	0.026	0.014 - 0.038
<b>pH</b>	7.4	7.20 - 7.60



Por el sueño en el  
que un día todos los  
seres vivos tengan  
el mismo valor

